



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**“VALORACIÓN DE LA ESTABILIDAD PLASMÍDICA  
EN CEPAS BACTERIANAS CON EL MÉTODO DE  
CONSERVACIÓN EN SUELO MODIFICADO ESTÉRIL”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**PQFB JANET KARINA HERNÁNDEZ RAMÓN**

**ASESOR**

**QFB RICARDO VEGA TAVERA**

**CO-ASESOR**

**QFB KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ**

**MORELIA, MICH. JUNIO 2013**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MÉDICA DE  
LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

QFB RICARDO VEGA TAVERA

Y

QFB KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ



*“Me siento satisfecho con el misterio y eternidad de la vida, con el conocimiento de una ínfima parte de la maravillosa estructura del mundo real, y como la devota lucha por comprender una fracción, aunque sea mínima, de la razón que se manifiesta en la naturaleza”.*

*La persona comprometida con la ciencia descubre que “las leyes de la naturaleza manifiestan la existencia de un espíritu superior al hombre, ante el cual, con nuestros modestos poderes debemos ser humildes”.*

**A. Einstein**



## AGRADECIMIENTOS

Como expresar mi gratitud a tantas personas que estuvieron conmigo en todo este tiempo, el apoyo y las palabras de aliento. Antes que a nadie quiero agradecer a Dios por ponerme en este camino.

A mis padres y hermanos que me han enseñado a defender lo que más amo, gracias por sus regaños y críticas me han convertido en una persona perseverante.

No existen palabras para decir lo agradecida que estoy con MSP. Karla Domínguez G., gracias por permitirme vivir este maravilloso sueño hecho realidad, las enseñanzas que me has dado son oro puro, las aventuras vividas, las experiencias compartidas y sobre todo tu amistad de verdad muchas gracias te quiero muchísimo.

Al QFB. Ricardo Vega; nunca me imagine que mi profesor de la preparatoria se convertiría en mi asesor y un gran amigo, gracias por creer en mí.

Los caminos del destino son verdaderamente caprichosos; quien diría que mi curiosidad me llevaría a involucrarme en este proyecto, al ver un muchacho siempre muy ocupado decidí ayudarlo en sus arduas labores y este joven se convirtió en uno de mis mejores mentores y amigos gracias QFB. Ricardo Soria siempre recordare todas las horas de trabajo en el laboratorio y nuestras largas platicas siempre acompañadas de risas; muchas gracias Chinito eres parte importante de mi vida.

Al D.C. Carlos Cortes Penagos por brindarme su apoyo incondicional en este proyecto.

A mi muy querido M.C. Luis José Flores el que me ha enseñado que no importa las veces que uno se caiga, lo importante es las veces en las que te levantas con la frente en alto y con las ganas de seguir adelante. Gracias por la confianza, por las enseñanzas, la paciencia y la constancia en la parte más importante de este proyecto.

Los pilares de mi vida al paso por mi preparación profesional, mis grandes amigos Nallely, Ana, Claudia, Polo, Gerardo, Mago; gracias por su apoyo, comprensión y consejos; ustedes han estado ahí en los momentos más difíciles de mi vida, muchas gracias.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a mis doctores favoritos, la D.C. Silvia Jiono Cerezo y el D.C. Jorge Cerna, con su gran sabiduría y amistad me han enseñado una valiosa lección de vida.

Agradezco a la QFB. Sandra Suarez y QBP. Alicia Gómez Reyes por el apoyo en la realización de este proyecto.

A Yazmín Cuevas por tus consejos y el ánimo que me has contagiado, muchas gracias te quiero mucho.

Y para finalizar, pero no por eso son de menor importancia, a los que ahora puedo considerar mis amigos Salvador "Chavita", Molano, Sistos, Gloria, Efraín, Agustín "Pato", Cristal, Saigo y una disculpa si olvidé a alguien; que al igual que yo son amantes de la Microbiología y me han ayudado en las tareas menos agraciadas de lo que hoy puedo nombrar tesis.

Esto no es un trabajo de una sola persona sin no de un gran equipo, y por eso tan solo puedo decir:

**¡GRACIAS, TOTALES!**

## Índice

	<b>PÁGINA</b>
<b>I. ABREVIATURAS</b>	IX
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	XI
<b>III. ÍNDICE DE TABLAS</b>	XII
<b>IV. RESUMEN</b>	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	2
<b>2.1. La conservación a través de la historia.</b>	2
<b>2.2. Métodos de conservación.</b>	3
<b>2.2.1. Métodos de conservación a largo plazo.</b>	4
<b>2.2.2. Métodos alternativos.</b>	8
<b>2.2.3. Métodos restringidos.</b>	9
<b>2.3. Plásmidos.</b>	13
<b>2.4. RFLP.</b>	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>4. HIPÓTESIS</b>	16
<b>5. OBJETIVOS</b>	16
<b>5.1. Generales.</b>	16
<b>5.2. Particulares.</b>	16
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	17

<b>7. MATERIALES</b>	18
7.1. Material biológico.	18
7.2. Suelo modificado estéril.	19
7.3. Cristalería.	20
7.4. Medios de cultivo.	20
7.5. Equipos	21
7.6. Reactivos.	22
7.7. Insumos.	23
<b>8. METODOLOGÍA</b>	25
8.1. Conservación en suelo modificado estéril.	25
8.1.1. Preparación del medio.	25
8.1.2. Conservación.	25
8.2. Recuperación.	26
8.3. Pruebas fenotípicas.	27
8.4. Viabilidad.	28
8.4.1. Método de Miles & Misra.	28
8.5. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.	29
8.6. Extracción de plásmidos.	31
8.6.1. RFLP.	36
8.6.2. Electroforesis.	36
<b>9. RESULTADOS</b>	37
9.1. Pruebas fenotípicas.	37

<b>9.2. Viabilidad.</b>	39
<b>9.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.</b>	40
<b>9.3.1. Cepas Gram positivas.</b>	40
<b>9.3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>.</b>	40
<b>9.3.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> (2).</b>	41
<b>9.3.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> (3).</b>	42
<b>9.3.1.4. <i>Paenibacillus alvei</i>.</b>	43
<b>9.3.1.5. <i>Bacillus coagulans</i>.</b>	44
<b>9.3.1.6. <i>Bacillus spp</i>.</b>	45
<b>9.3.1.7. <i>Bacillus subtilis</i>.</b>	46
<b>9.3.1.8. <i>Bacillus cereus</i>.</b>	47
<b>9.3.1.9. <i>Bacillus mycoides</i>.</b>	48
<b>9.3.1.10. <i>Bacillus megaterium</i>.</b>	49
<b>9.3.2. Cepas Gram negativas.</b>	50
<b>9.3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28953.</b>	51
<b>9.3.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</b>	52
<b>9.3.2.3. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</b>	53
<b>9.3.2.4. <i>Escherichia coli</i>.</b>	54
<b>9.3.2.5. <i>Providencia stuartii</i>.</b>	56
<b>9.3.2.6. <i>Providencia rettgeri</i>.</b>	57
<b>9.4. Extracción de plásmidos.</b>	59
<b>9.5. RFLP.</b>	61



<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>12. PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>
<b>14. ANEXOS</b>	<b>73</b>

## I. ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection.
WDCM	Centro de Datos Mundial de Microorganismos.
WFCC	Federación Mundial de Colecciones de Cultivos.
IUBS	Unión Internacional de Ciencias Biológicas.
IUMS	Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas.
ACC	Academia de Ciencia de Cuba.
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo.
UMSNH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
°C	Grados centígrados.
ml	Mililitros.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Kb	Kilobase.
pb	Pares de bases.
CCC	Circular Covalentemente Cerrada.
μl	Microlitro.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
μg	Microgramo.
lb	Libra.
MH	Müller-Hinton.
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar.
LIA	Agar Hierro Lisina.
MIO	Movilidad Indol Ornitina.

UFC	Unidad Formadora de Colonia.
h	Hora.
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute.
BHI	Infusión Cerebro Corazón.
mm	Milímetro.
RFLP	Polimorfismo de extensión de fragmentos de restricción.
rpm	Revoluciones por minuto.
min	Minuto.
LB	Luria Bertani.
mg	Miligramos.
mM	Milimolar.
M	Molar.
N	Normal.

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Diagrama general del método de conservación.	25
<b>Figura 2.</b> Diagrama general de recuperación.	26
<b>Figura 3.</b> Método de Miles & Misra	28
<b>Figura 4.</b> Diagrama de pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer modificado.	30
<b>Figura 5.</b> Mapa de restricción de <i>W3110 pACYC 184 E. coli</i>	33
<b>Figura 6.</b> Diagrama de electroforesis.	34
<b>Figura 7.</b> Ensayos de identidad.	36
<b>Figura 8.</b> Viabilidad de <i>P. aeruginosa</i> por el método de Miles-Misra.	38
<b>Figura 9.</b> Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Listeriaceae</i> .	39
<b>Figura 10.</b> Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la familia <i>Bacillaceae</i> y <i>Paenibacillaceae</i> .	41
<b>Figura 11.</b> Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Pseudomonaceae</i> .	43
<b>Figura 12.</b> Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	45
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos bacterianos después de 32 meses de la conservación.	46
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de conservación plasmídica después de 32 meses de conservación	47
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de conservación plasmídica en las cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.	47
<b>Figura 16.</b> Restricción con la enzima <i>EcoR</i> I.	48
<b>Figura 17.</b> Restricción con la enzima <i>Hind</i> III.	49

### III. ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición química de la turba.	19
<b>Tabla 2.</b> Composición química de la perlita.	19
<b>Tabla 3.</b> Ensayos de identidad y pureza.	27
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de digestión.	34
<b>Tabla 5.</b> Ensayo de identidad antes de la conservación.	35
<b>Tabla 6.</b> Ensayo de identidad después de 32 meses de la conservación.	36
<b>Tabla 7.</b> Viabilidad antes de la conservación y después de 32 meses de preservación.	37
<b>Tabla 8.</b> Resultados de las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Listeriaceae</i> .	39
<b>Tabla 9.</b> Resultados de las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de las Familias <i>Paenibacillaceae</i> y <i>Bacillaceae</i> .	40
<b>Tabla 10.</b> Resultados de las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Pseudomonaceae</i> .	43
<b>Tabla 11.</b> Resultados de las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	44

## IV. RESUMEN

Los métodos de conservación a temperatura ambiente son accesibles y de fácil metodología sin embargo se corre el riesgo que los microorganismos crezcan y espontáneamente cambian sus características genéticas (mutación, pérdida de plásmidos, etc.). El método de conservación en "suelo modificado estéril" a temperatura ambiente ha demostrado ser una muy buena opción para la preservación para diversos géneros bacterianos ya que cumple el propósito primordial de cualquier método de conservación convencional. Se realizaron pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos 16 cepas bacterianas antes y después de 32 meses de la conservación en "suelo modificado estéril". Para validar la preservación de plásmidos de resistencia se realizó una extracción de DNA plasmídico por medio de lisis alcalina después de la conservación además estos se analizaron mediante RFLP con las enzimas de restricción *Hind* III y *Eco*R I.

Obteniendo una base de comparación en la conservación de plásmidos de resistencia a antimicrobianos antes y después de la preservación con este método. Los resultados obtenidos nos demuestran una conservación del 51% de los plásmidos en las cepas Gram positivas y una preservación del 100% en las cepas Gram negativas. En estudios anteriores se ha demostrado que los métodos de conservación a temperatura ambiente no son adecuados si se requiere mantener estable y viable a los microorganismos por un largo periodo de tiempo.

### PALABRAS CLAVE

Método, conservación, estabilidad, susceptibilidad, antimicrobianos, plásmidos, enzimas de restricción.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en los diferentes sectores. Estos necesitan ser viables al menos durante el estudio y los experimentos, para lo cual deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos garantizando su disponibilidad (Weng *et al.*, 2003).

Los objetivos del trabajo con microorganismos pueden ser variados, y pueden incluir investigaciones medioambientales, taxonómicas, agrícolas, biomédicas e industriales. La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la ciencia. Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio (Morales *et al.*, 2010).

Los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos microbiológicos. Los cultivos de referencia o controles de alta calidad son utilizados en un amplio número de determinaciones. Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio. Los microorganismos poseen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, mantenerlos viables y genéticamente estables; por lo que es una de las inquietudes al trabajar con estos organismos (Del Puerto *et al.*, 2009).

Se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo lo más cercano posible al aislamiento original. La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (González *et al.*, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. LA CONSERVACIÓN A TRAVÉS DE LA HISTORIA.

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento en la solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura a través la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía o en la conservación del medio ambiente (Llop *et al.*, 1998).

El surgimiento de los medios de cultivos sólidos para el crecimiento de los microorganismos, y el éxito de los primeros aislamientos de cultivos puros, marcaron la necesidad de preservarlos para el futuro. La primera colección de cultivos microbianos se estableció en 1880 en Praga, Viena, por Frántisek Král, quién tuvo una visión de la importancia que las colecciones de cultivos tendrían para el desarrollo de la ciencia. Se conoce que en este período también se establecieron otras colecciones de cultivos en los principales institutos de París, Berlín, Londres y Japón, pero la información al respecto es escasa. En 1890 Král publicó el primer catálogo de cultivos microbianos, la cual se mantuvo durante 21 años. Actualmente algunos de los materiales que formaron parte de ella se conservan en el museo de Historia Natural de Viena. De acuerdo a Porter en "La visión del mundo de Colecciones de Cultivos" en 1976, la otra colección más antigua fue creada en 1906 por la Asociación Internacional de Botánicos, en Baarn, Holanda. En 1919, se estableció la colección del Commonwealth Mycological Institute del Reino Unido, y en 1925 la de Estados Unidos (American Type Culture Collection, ATCC). Estas colecciones son internacionalmente reconocidas en las cuales se mantienen millones de cepas microbianas, algunas de ellas patentadas para procesos biotecnológicos. El número de colecciones de cultivos se ha incrementado y actualmente existen 469 colecciones en 61 países registrados en el Centro de Datos Mundial de Microorganismos (WDCM). Estas pueden ser estatales, semi-gubernamentales, sustentadas por universidades, industrias, o privadas; y pueden especializarse en las ramas: agrícola, forestal, marina, médica, veterinaria, industrial y otros (WDCM, 2002). Sin embargo existen muchas otras colecciones establecidas y que no están registradas en la WDCM.



El establecimiento de organizaciones mundiales, regionales y nacionales ha favorecido la interacción y colaboración entre las colecciones (Malik, 1992; Hawksworth y Aguirre-Hudson 1994). La máxima organización que representa las colecciones de cultivos es la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), fundada en 1963. Esta es una federación de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) y una comisión de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (IUBS), tiene la responsabilidad de promover y propiciar el desarrollo de las colecciones de cultivos de microorganismos y cultivos de células (Kirsop, 1990). En Cuba, a fines de la década del 70 y principio de la década del 80, la entonces Academia de Ciencia de Cuba (ACC), decidió comenzar la organización del Cepario Nacional para localizar e inventariar las colecciones de interés sanitario, agrícola e industrial existentes en el país. En 1987 se hizo otro intento, en donde esta ocasión se determinó que la ACC debería ser el centro coordinador nacional sobre colecciones de microorganismos, células, plásmidos, genes e hibridomas (González *et al.*, 2010).

## 2.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general. Vamos a resumir estos métodos agrupándolos en tres apartados, que son: Métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos (García y Uruburu, 2000).

### 2.2.1. Métodos de conservación a largo plazo.

Estos métodos se consideran los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas de la cepa preservada. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: congelación y liofilización (Del Puerto *et al.*, 2009).

#### a) Conservación por congelación.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. De esta forma al no existir agua libre no hay crecimiento celular. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura (Chater *et al.*, 1999). Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir equipos especializados, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema de congelación produzca una elevación no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas (Gherna, 1998).

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

1. Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

2. Velocidad en la congelación y descongelación: Se debe cuidar la velocidad de congelamiento el cual por lo general se controla (alrededor de 1°C por minuto hasta obtener -30°C) y siguiendo un protocolo de descongelamiento adecuado (la descongelación debe de ser rápida en un baño de agua a 37°C que toma cerca de 1 minuto para el caso de un vial).
3. Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C. En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C. Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce (Perry, 1995).

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación con cierre hermético), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con "criobolas" (bolas de tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

4. Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos

compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20% (Hubálek, 2003). También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar (Stoycheva, Venkov y Tsvetkov, 2007).

#### **b) Conservación por liofilización.**

Esta metodología consiste en pasar el agua de un producto de un estado sólido a gas sin pasar por el estado líquido mediante un proceso conocido como sublimación. Su uso es muy amplio en la conservación de microorganismos, una de las razones predominantes para utilizar la liofilización como método de conservación es la de que algunas cepas son genéticamente inestables por lo que pueden tener cambios en sus características genotípicas y fenotípicas y lo principal permite la conservación a largo plazo.

Para obtener las características de los microorganismos durante la sublimación es importante adicionar sustancias denominadas “soportes de liofilización” ejemplos de estas sustancias son: polivinilpirrolidina, azúcares, proteínas, dextran, metil-celulosa, leche descremada entre otros. Es importante considerar la eficacia del proceso de liofilización y se puede determinar en función de la cuenta viable del microorganismo para determinar el porcentaje de supervivencia. Algunas metodologías incluyen la determinación de la viabilidad por que en el proceso se puede eliminar más del 80-90% de la carga bacteriana original midiendo unidades formadoras de colonias (UFC) o el método de Miles-Misra entre otros.

Factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

1. Tipo de microorganismo. Hay algunos microbios que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos

filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.

2. Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de  $10^8$ - $10^9$  células/ml en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
3. Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de  $-50^{\circ}\text{C}$ .
4. Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
5. Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
6. Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, preferentemente a  $18^{\circ}\text{C}$  y sin bajar de los  $0^{\circ}\text{C}$ . Los liofilos se deben guardar en la oscuridad.

### **2.2.2. Métodos alternativos.**

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos (Snell y Kocur, 1991). Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

**a) Conservación por transferencia periódica.**

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas conforme pasa el tiempo tienden a segregar productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco.

Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C-8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Hay que tener en cuenta que los microorganismos aerobios estrictos, como por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados. Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos (Smith y Onions, 1994).

**b) Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.**

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en criotubos de los anteriormente mencionados. En este caso la concentración celular no debe ser superior a  $10^4$ - $10^5$  células/ml en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo (Bueno y Gallardo, 1998). En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida.

Los resultados obtenidos por la CECT (2005) en la conservación de microorganismos por este método muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo, etc.

**2.2.3 Métodos restringidos.**

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. Los cuatro métodos que vamos a citar se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células (García, Sureiro y Garrido, 2000).

**a) Desecación en papel de filtro.**

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células (Fages, 1990).

**b) Desecación en suelo, arena, silicagel, etc.**

Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método. Es importante esterilizar el soporte por aplicación de calor seco, no esterilizar en autoclave.

La tierra estéril puede ser inoculada con cultivo e incubada varios días para inducir la esporulación de bacilos aerobios y anaerobios. Una vez que la esporulación se manifiesta, la tierra es secada (desecador) y el cultivo es mantenido de esta forma en una atmósfera seca o en refrigerador.

El método ha sido utilizado ampliamente con hongos y actinomicetos, los cuales han sido mantenidos en estas condiciones varios años. También se pueden utilizar tierra para la conservación directa de suspensiones de esporas (Hill, 2000).



**c) Deseccación en bolitas de alginato.**

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales (Fages, 1990).

**d) Deseccación en sal gorda (halobacterias).**

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible (García y Uruburu, 200).

**e) Suelo estéril.**

El método de conservación en suelo estéril siempre se ha tomado como última elección ya que los nutrientes y la humedad son reducidos considerablemente, limitando no solo el metabolismo bacteriano si no también su periodo de vida; además depende de otros factores como el pH, tipo de suelo, compuestos o sustancias contenidos en el suelo e impurezas (Fernández y Fernández, 1997).

**f) Suelo estéril modificado.**

Existen métodos de preservación que utilizan la combinación de diferentes métodos de conservación; este sistema está formado por la combinación de un suelo denominado “turba”, el cual es un material orgánico rico en fuentes de carbono y nitrógeno, y un mineral de silicio llamado “perlita” el cual es un material volcánico. Este método fue diseñado recientemente en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H. (Soria, 2010).

La combinación de estos dos materiales es un excelente soporte para mantener viables a las cepas bacterianas; ya que el suelo proporciona los nutrientes y como es rico en carbono este mantiene libre de metabolitos secundarios los cuales pueden ser un factor desfavorable para la permanencia de los microorganismos en este medio; el mineral al ser sometido a altas temperaturas y presiones (durante la esterilización) aumenta su volumen y absorbe grandes cantidades de agua el cual es favorable para mantener la viabilidad de los organismos.

Cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, cuando éstas se recuperan para hacer nuevos lotes para su conservación o para trabajar con ellas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés. Primero habría que revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en un medio líquido no selectivo, es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, para recuperarse en caso de daños a la pared y algunos otros; a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario.

### 2.3 PLÁSMIDOS.

Las condiciones de cultivo y la naturaleza de las cepas bacterianas determinan la estabilidad genética de las mismas, debido a que son susceptibles a cambios genéticos o a la pérdida de material genético extracromosomal como lo son los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómicas de replicación autónoma. Aunque no son esenciales para la sobrevivencia de las bacterias, los plásmidos poseen una amplia variedad de determinantes genéticos que le permiten a las bacterias sobrevivir a ambientes adversos o competir en mejores condiciones con otros microorganismos que ocupan el mismo nicho ecológico. Los plásmidos se han encontrado en la mayoría de las bacterias estudiadas. Con el desarrollo de la Biología molecular, los plásmidos han adquirido un papel importante ya que son de gran utilidad en las técnicas de DNA recombinantes, principalmente como vectores o vehículos de clonación (Gerhardt *et al.*, 1994).

El tamaño de los plásmidos varía de 1 a más de 200 kilobases (mil pares de bases, Kb). En algunos géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* se han encontrado plásmidos, mayores de 200 Kb (Hansen y Olsen, 1978), denominados megaplásmidos, los cuales contienen genes que les confieren resistencia a metales, antibióticos, etc. Por otro lado, en cepas de géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se han encontrado plásmidos pequeños (1-2 Kb), denominados miniplásmidos, a los cuales no se le han encontrado alguna función (Christiansen *et al.*, 1973).

Los plásmidos bacterianos generalmente se encuentran en forma circular covalentemente cerrada (CCC) formando moléculas superenrolladas (con giros superhelicoidales), aunque sean reportado plásmidos lineales (Kim *et al.*, 1990). Si una de las cadenas del plásmido circular se rompe, los giros se pierden y se forma un “círculo abierto”; cuando ambas cadenas se rompen, se genera una molécula lineal (Stryer, 1990). La pequeña porción de las formas circular abierta y lineal que se encuentran en los extractos celulares, son derivados de las moléculas en forma CCC que se rompen al lisar la célula.

Otras formas de plásmidos que se encuentran en los lisados celulares son los dímeros, trímeros y multímeros generados por errores en el proceso de replicación (Hardy, 1986).

#### **2.4. RLFP.**

La detección del RLFP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la posibilidad de comparar patrones de bandas generados mediante digestión con enzimas de restricción del ADN patrón.

Una enzima de restricción es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a éste, dependiendo de la enzima. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos (Lodish, 2003).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

El sistema más empleado para la conservación del material genético contenido en las cepas bacterianas (plásmidos), es el de la liofilización debido a que la temperatura de trabajo es muy baja y por lo tanto los productos termolábiles no se alteran, no existe peligro de oxidación por la ausencia de aire durante el proceso, no hay agua libre; por lo tanto no hay peligro de hidrólisis ni de crecimiento bacteriano (Barbosa y Vega, 2000); sin embargo, estos métodos no están al alcance de muchos laboratorios debido a la inversión económica que representa y al requerir personal altamente calificado para estos procesos.

En métodos de conservación que se mantienen a temperatura ambiente, el riesgo de cambios fenotípicos y genotípicos es alto debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales normales (temperatura, humedad, entre otros) y esto implica una alta probabilidad de pérdida en el material genético (plasmídico).

Por lo anterior, y al no contar con estudios previos a cerca de las condiciones de conservación de plásmidos en métodos de conservación denominados “restringidos”; en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Químico Farmacobiología en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se desarrolló un método de conservación en suelo modificado estéril a temperatura ambiente en el cual se mantienen conservados diferentes géneros bacterianos desde el año 2009; y utilizando técnicas de biología molecular, pruebas de identidad, pureza y viabilidad se pretende poner en evidencia la estabilidad genotípica y fenotípica de las cepas bacterianas conservadas con el método mencionado, y de resultar favorable éste, pueda ser empleado de manera cotidiana por laboratorios o instituciones que requieran conservar microorganismos sin que estos sufran modificaciones en sus características originales.

#### **4. HIPÓTESIS.**

El método de conservación en suelo modificado estéril a temperatura ambiente es funcional para la conservación de diversos géneros bacterianos debido a que logra preservar los plásmidos de resistencia aún sin contener presión selectiva como tal, debido a que los componentes hacen mantener a las bacterias en estado de alerta por las condiciones “hostiles” del propio medio.

#### **5. OBJETIVOS.**

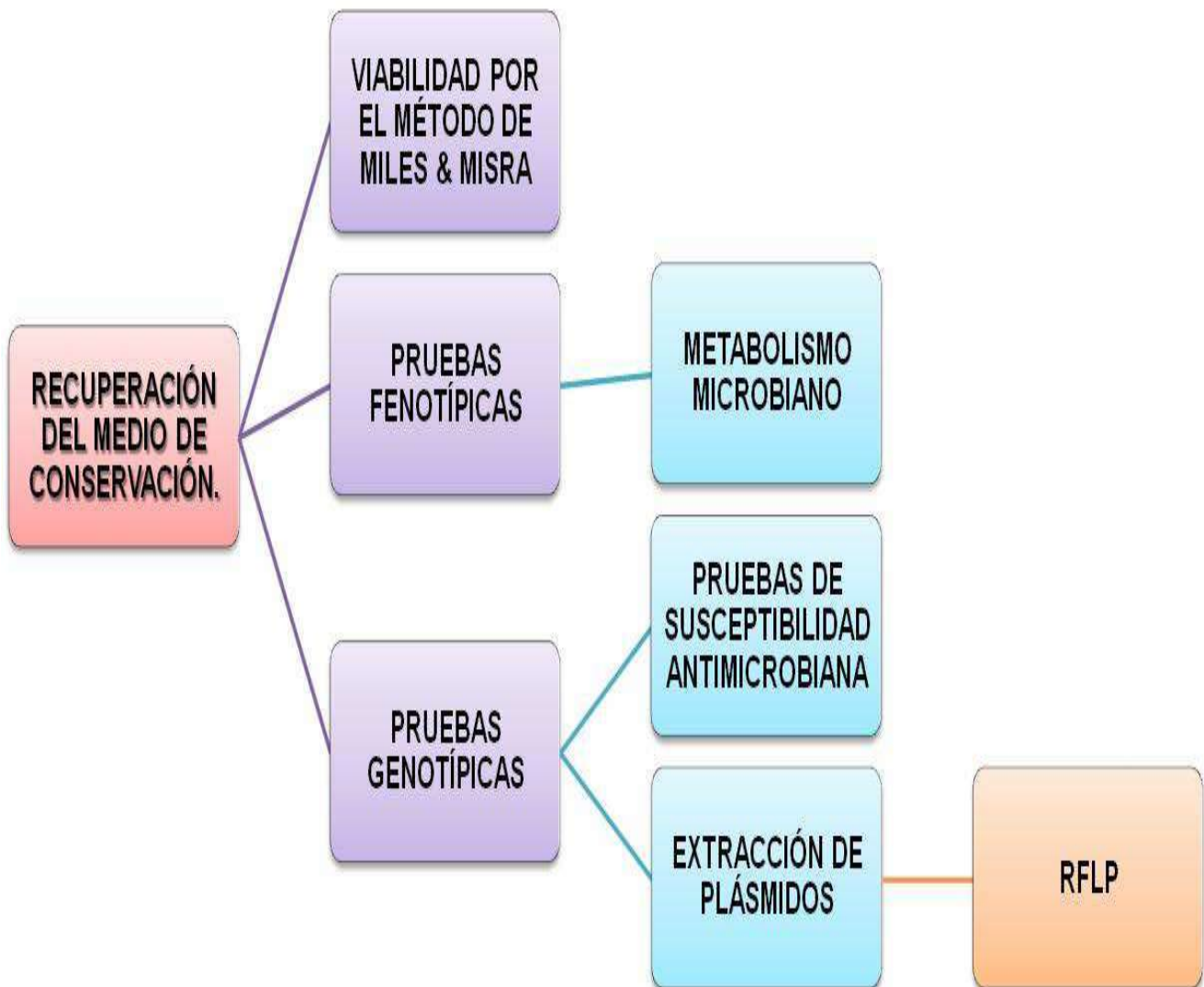
##### **5.1. GENERALES.**

Evaluar y validar la estabilidad fenotípica y genotípica de las 16 cepas bacterianas preservadas con el método de conservación en suelo modificado estéril.

##### **5.2. PARTICULARES**

1. Evaluar la perdurabilidad de las características fenotípicas a través de ensayos de identidad y pureza a través del comportamiento metabólico y la morfología macro y microscópica después de 32 meses de conservación.
2. Evidenciar por medio de técnicas de susceptibilidad a antimicrobianos la relación que existe entre la resistencia a antibióticos y la presencia de plásmidos antes y después de la conservación.
3. Determinar la presencia de plásmidos contenidos en las cepas conservadas después de 32 meses de su preservación a través de la extracción de plásmidos por lisis alcalina.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



## 7. MATERIALES.

### 7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se estudiaron 16 cepas bacterianas en las que se incluyen 2 cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC), estas fueron preservadas con el método de “suelo modificado estéril” a temperatura ambiente que se encuentran en el cepario y colección de microorganismos del el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H.

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Listeria monocytogenes*
3. *Listeria monocytogenes*
4. *Paenibacillus alvei*
5. *Bacillus coagulans*
6. *Bacillus spp.*
7. *Bacillus subtilis*
8. *Bacillus cereus*
9. *Bacillus mycoides*
10. *Bacillus megaterium*
11. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
12. *Pseudomonas aeruginosa*
13. *Escherichia coli* ATCC 25923
14. *Escherichia coli*
15. *Providencia stuartii*
16. *Providencia rettgeri*

#### **Cepa control**

17. *E. coli* W3110 pACYC 184



## 7.2. SUELO MODIFICADO ESTÉRIL.

El suelo utilizado se le denomina Turba (66%) el cual es un material orgánico, de color pardo oscuro y rico en carbono, este medio también contiene un mineral llamado Perlita (34%) el cual es un vidrio volcánico amorfo que tiene un contenido de agua relativamente alto. Es un mineral que aparece en la naturaleza, y tiene la propiedad poco común de expandirse muchísimo cuando se la calienta lo suficiente (durante la esterilización).

El análisis de la composición de la turba muestra el siguiente contenido.

**Tabla 1.** Composición química de la turba.

Compuesto	Porcentaje
Carbono	59 %
Hidrógeno	6 %
Oxígeno	33 %
Nitrógeno	2 %
<i>Materias volátiles</i>	<i>60 %</i>

(Pontevedra-Pombal, X. & col 2001)

El análisis de químico de perlita muestra la siguiente composición:

**Tabla 2.** Composición química de la perlita.

Compuesto	Formula química	Porcentaje
Dióxido de silicio	SiO <sub>2</sub>	70 – 75 %
Óxido de aluminio	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	12 – 15 %
Óxido de sodio	Na <sub>2</sub> O	3 – 4 %
Óxido de potasio	K <sub>2</sub> O	3 – 5 %
Óxido de hierro	Fe <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.5 – 2 %
Óxido de magnesio	MgO	0.2 – 0.7 %
Óxido de calcio	CaO	0.5 – 1.5 %
<i>Perdida en el horno de agua químicamente combinada</i>	H <sub>2</sub> O	3 – 5 %

(Quiroz, R. & col 2008)

### 7.3. CRISTALERÍA.

- Tubos de ensaye de 13X100 con tapón de rosca marca Kimax®.
- Tubos de ensaye de 13X75 con tapón de caucho.
- Tubos de ensaye de 16X100 con tapón de rosca marca Pyrex®.
- Tubos de ensaye 12x72 sin marca.
- Matraces Erlen-Meyer de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml. Marca Kimax®.
- Probeta graduada de 100, 500 y 800 ml. Marca Pyrex®.
- Pipeta graduada de 1, 2, 5, 10ml. Marca Pyrex®.
- Cajas petri marca Kimax®.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Pipeta Pasteur de vidrio.

### 7.4. MEDIOS DE CULTIVO.

- Agar Luria Bertani.
- Caldo Luria Bertani (Ver anexo 1).
- Caldo Nutritivo marca Bioxon®.
- Agar de Mueller-Hinton marca Bioxon®.
- Caldo Mueller-Hinton marca Bioxon®.
- Agar Gelosa Sangre marca Bioxon®.
- Agar Bilis-Esculina marca BD®.
- Agar hierro Triple Azúcar marca Merck®.
- Agar Hierro Lisina marca Merck®.
- Agar Citrato marca Bioxon®.
- Agar Fenilalanina marca Bioxon®.
- Agar Movilidad Indol Ornitina marca Bioxon®.
- Caldo Malonato marca Bioxon®.
- Caldo Rojo de metilo / Vogues-Proskauer marca Merck®.
- Caldo urea marca Bioxon®.
- Caldo Rojo de Fenol marca BD®.

- Agar – Agar marca Dibico®.
- Azúcares marcas (Sigma®, BD®).
  - Arabinosa.
  - Glucosa.
  - Inositol.
  - Manitol.
  - Lactosa.
  - Rafinosa.
  - Ramnosa.
  - Sacarosa.
  - Sorbitol.
  - Trehalosa.
  - Xilosa.

#### 7.5. EQUIPO.

- Incubadora marca Felisa®.
- Refrigerador General Electric® modelo turbo plus cooling system.
- Autoclave de calor húmedo marca Presto Steele® modelo 21lt.
- Termo baño marca CIVEQ® modelo HH-1.
- Estufa de gas marca SAN-SON®.
- Lámpara de luz ultravioleta marca Minerallight® modelo UVGL-25.
- Nefelómetro de Mac Farland.
- Microscopio óptico marca Carl Zeiss® modelo Stanford 25.
- Centrifuga marca Sol-Bat® modelo J-600.
- Micropipetas marca Biohit® de 10 a 100µl.
- Micropipetas marca RAININ® de 0.1 a 2 µl, 0.5 a 10 µl, 1 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl.
- Mechero tipo Fisher.
- Vortex marca Genie® modelo 2.
- Timer marca Control Company®.

- Cámara Fotográfica marca Panasonic modelo Lumix®.
- Microcentrífuga marca Eppendorf® modelo S415D.
- Microcentrífuga marca HERMLE® modelo Z400K.
- Ultracongelador marca Thermo Forma® modelo 906.
- Foto-documentador marca Bio-Rad® modelo Chemic Doc.
- Thermoblock marca Eppendorf®.
- Transiluminador marca WEALTEC®.
- Máquina de hielo marca Scotsman®.
- Balanza analítica marca OHAUS® modelo Adventurer.
- Microondas marca Magic Chef®.
- Fuente de poder marca Bio-Rad®.
- Cámara de electroforesis marca Owl®.

#### 7.6. REACTIVOS.

- Agua libre de nucleasas (grado HPCL) Qiagen®.
- Sacarosa marca BIOXON®.
- 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris).
- Ácido clorhídrico.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Lisozima de albumina de huevo marca SIGMA® L6876-1G.
- Hidróxido de sodio.
- Dodecilsulfato sódico (SDS).
- Acetato de potasio.
- Ácido acético glacial.
- Fenol saturado.
- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.
- Etanol absoluto.
- RNAasa Qiagen®.
- Agarosa Invitrogen®.
- Bromuro de etidio Promega®.

- Agua destilada.
- TRIS-EDTA-Acido Bórico (TBE) 10x.
- Buffer de carga para electroforesis Orange G 6x (Ver anexo 2).
- Marcador de peso molecular 1 Kb marca Genecraft®.
- Enzima de restricción *EcoR* I marca Invitrogen®.
- Enzima de restricción *Hind* III marca New England Biolabs®.

### 7.7. INSUMOS.

- Hisopos de algodón.
- Microviales de 1.5 ml.
- Astillas de madera.
- Ampicilina sódica marca ORSABE®.
- Discos de antibióticos marca OXOID®.
  - Discos de susceptibilidad de Ampicilina 10 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Ampicilina / Sulbactam 20 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Penicilina 10 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Piperacilina / Tazobactam 110 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Amoxicilina /Ác. Clavulanico 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Amikacina 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Carbenicilina 100 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Cefotaxima 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Ceftazidima 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Ceftriaxona 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Netilmicina 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Ofloxacina 5 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Tetraciclina 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Trimetropim / Sulfametoxazole 25 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Cefazolina 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Cefalotina 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Cloramfenicol 30 µg.
  - Discos de susceptibilidad de Fosfomicina 200 µg..

- Discos de susceptibilidad de Gentamicina 10 µg.
- Discos de susceptibilidad de Ticarcilina / Ác. Clavulanico 85 µg.
- Discos de susceptibilidad de Trimetropim 5 µg.

## 8. METODOLOGÍA.

### 8.1. CONSERVACIÓN EN SUELO MODIFICADO ESTÉRIL.

#### 8.1.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO.

El suelo se preparó agregando una porción del 66.6% de “turba” y 33.3% del mineral “perlita”. Se racionó 7gr del preparado en viales de boca ancha de 20x100 con tapón de rosca.

Posterior a esto se sometió a un tratamiento de esterilización durante 3 horas a 15 libras de presión a 121 °C. Los tubos al salir de la autoclave se cerraron herméticamente y se enfriaron a temperatura ambiente. (Soria, 2010).

#### 8.1.2. CONSERVACIÓN.

Se realizó una siembra en medio de cultivo Gelosa Mueller-Hinton por estría masiva en placas Petri de 20 x100, las cuales se incubaron por 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo se cosechó con una espátula estéril (Figura 1), en caso de no contar con la espátula se puede sustituir por abatelenguas estériles, raspando la placa se recuperó la biomasa bacteriana que en condiciones de esterilidad se introdujo en un vial con suelo estéril y se homogenizó con la cucharilla. (Soria, 2010).



**Figura 1.** Diagrama general del método de conservación en “suelo modificado estéril”. Siembra masiva en dos placas de gelosa M-H para la obtención de biomasa la cual será conservada en viales con suelo estéril.

## 8.2. RECUPERACIÓN.

Para evitar contaminaciones con otras bacterias se realizó la recuperación de la siguiente manera:

Con una astilla de madera previamente humedecida en agua estéril se introdujo en el vial con suelo y a continuación se suspendió la tierra adherida en un tubo con 2 ml de agua estéril, dejando sedimentar por 5 min. Mediante una pipeta Pasteur se transfirió 1 ml aproximadamente del sobrenadante a un caldo soya tripticaseína. Incubando a una temperatura de 37°C durante 24 h (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama general de recuperación del método de conservación en “suelo modificado estéril”. Con una astilla de madera se toma suelo y se suspende en agua estéril dejando sedimentar 5 min, transferir a CST e incubar.

## 8.3. PRUEBAS FENOTÍPICAS.

La identidad de los cultivos bacterianos se llevó a cabo utilizando pruebas bioquímicas convencionales, la pureza de las bacterias se evaluó por observación macro y microscópica del cultivo, teñido por la técnica implementada por Gram en 1884, después de 32 meses de la conservación. Estas características se midieron utilizando 22 pruebas para poner en evidencia su metabolismo bioquímico, que se encuentran resumidas en la siguiente tabla:



**Tabla 3.** Ensayos de identidad y pureza.

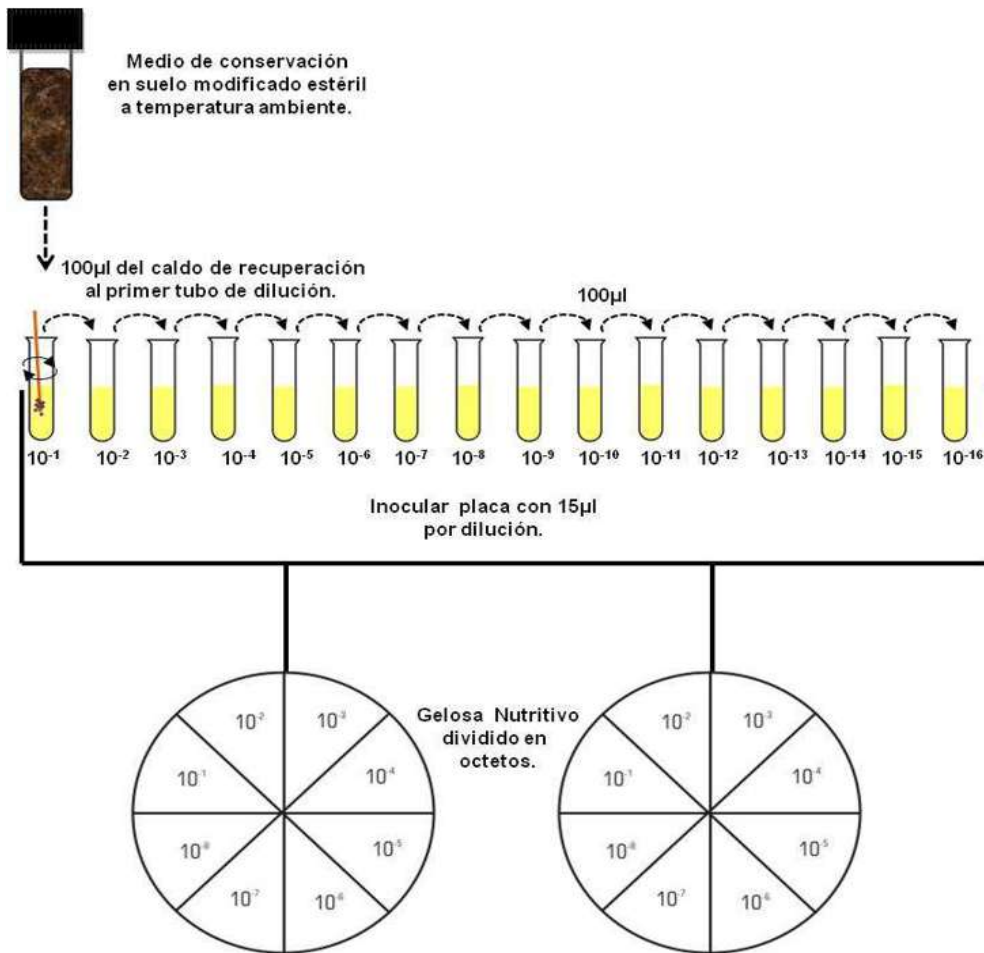
<b>CONVENCIONALES</b>	<b>AZUCARES</b>		<b>OTROS</b>
TSI	Arabinosa	Sorbitol	Tinción Gram
LIA	Dextrosa	Lactosa	Oxidasa
Citrato	Inositol	Xilosa	Catalasa
Fenilalanina	Lactosa		Bilis Esculina
MIO	Manitol		
Malonato	Rafinosa		
Rojo de Metilo	Ramnosa		
Urea	Sacarosa		

#### **8.4. VIABILIDAD.**

##### **8.4.1. MÉTODO DE MILES & MISRA.**

Para medir la viabilidad se utilizó el método modificado de Miles & Misra (Miles y Misra, 1938).

Del medio de recuperación se toma una porción con la ayuda de una astilla de madera estéril humedecida previamente con el medio, suspendiendo lo adherido en el medio líquido (haciendo esto en dos ocasiones). Se realizaron 16 diluciones en caldo nutritivo, colocando 15µl de cada dilución en placas con gelosa nutritivo previamente divididas en octetos (Soria, 2010), en la última dilución en la que presentó crecimiento se contó el número de colonias, como se muestra en la figura 3.



**Fig. 3** Método de Miles-Misra modificado. Del medio de recuperación se realizan 16 diluciones en placas con gelosa nutritivo, incubación por 24h a 37°C.

Para calcular el exponente con crecimiento se sigue la siguiente fórmula.

$$UFC = C * x 10^X * Y$$

Donde:

“C” es el número de colonias contadas,

10<sup>x</sup> la dilución,

“Y” el número de gotas por µl que se depositan en el medio.

## **8.5. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA “MÉTODO DE KIRBY-BAUER”.**

Las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos por el método descrito por Kirby-Bauer (Bauer, Kirby y Col., 1938) pueden ser utilizadas como una herramienta para determinar alguna característica genotípica conocida o no, como sería el caso de la detección de plásmidos que confieren resistencia a algún antibiótico en particular.

La elección de los antibióticos a ensayar se realizó bajo los criterios del Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI).

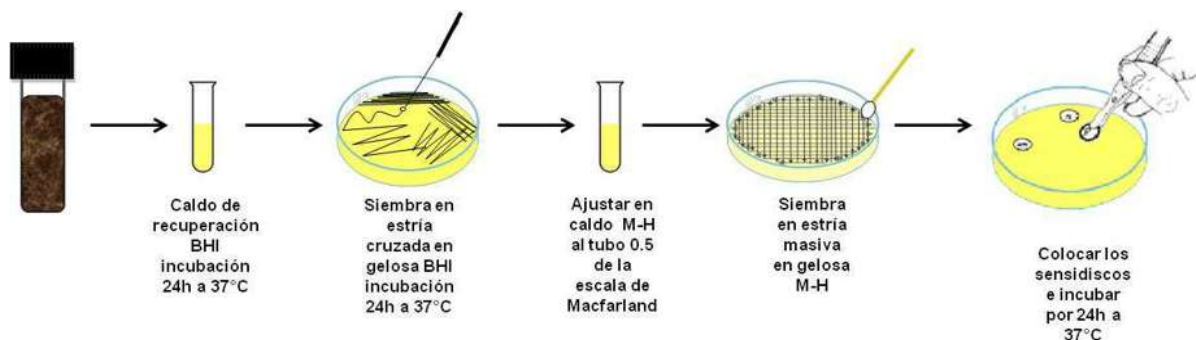
Se realizaron ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos a las 16 muestras antes de someterlas al método de conservación con el fin de obtener una base de datos y así poder comparar los resultados a lo largo de la conservación; a las cepas conservadas se le hicieron ensayos periódicos para observar cualquier modificación en el patrón obtenido inicialmente.

### Procedimiento:

Una vez recuperadas las cepas bacterianas del medio de conservación se sembró en Gelosa Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) en estría cruzada para la obtención de colonias aisladas. Se tomaron de 2 a 3 colonias morfológicamente iguales y se hace una suspensión en Caldo Mueller-Hinton hasta lograr una turbidez comparable a la solución de Mac Farland 0.5 (MacFarland, 1907), a continuación se introdujo el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Antes de retirarlo se debe escurrir sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.

Se sembró la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas, dejando secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos; estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se presionaron los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. En las placas de 150 mm no se colocarán más de 12 discos, y en las placas de 100 mm no es aconsejable colocar más de 6.

En seguida de la colocación de los discos las placas deben incubarse a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 18 h. Para detectar la meticilinorresistencia las placas deben incubarse 24 horas completas. Las placas se colocaron en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos, se midieron los halos de inhibición con la ayuda de una regla (en mm) y se compararon con las tablas proporcionadas por el CLSI (Ver anexo 3).



**Fig. 4** Diagrama de pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer modificado. Del medio de conservación se reactivan las cepas bacterianas en caldo BHI después del tiempo de incubación se aíslan colonias en medio sólido (gelosa BHI), se toman una o dos colinas en caldo M-H ajustando al tubo 0.5 de la escala de MacFarland y se realiza estría masiva para colocar los discos de antibiótico.

## 8.6. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS (LISIS ALCALINA).

Se realizó la extracción de plásmidos de las cepas bacterianas antes de la conservación y después de 32 meses conservadas en "suelo modificado estéril" a temperatura ambiente con el propósito de obtener una comparativa de la preservación y estabilidad genotípica. Esto se realizó de acuerdo al siguiente protocolo (*Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Brurke, 1981*).

Se centrifugó 4 ml de cultivo bacteriano durante 2 min. a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se recomienda que el cultivo sea en caldo LB con un tiempo de incubación de entre 12-18 h a 37°C para asegurar que el crecimiento se encuentre en la fase logarítmica. Después se decantó el sobrenadante y resuspendió la pastilla en 100 µl de la solución STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA a 10 mM). La lisis bacteriana consiste en la ruptura celular; esta ruptura puede ser controlada utilizando un medio isotónico (con la adición de estabilizadores osmóticos como la sacarosa) para la obtención protoplastos (Grampositivas) o esferoplastos (Gramnegativas). El EDTA quela los iones metálicos inactivando las nucleasas dependientes de cationes, también evita la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del DNA. El Tris-HCl rompe la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias permitiendo la acción a la lisozima.

Posteriormente se adicionó 20 µl de la solución de lisozima (20 mg/ml), mezclando ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. La razón principal de la lisozima es la degradación de la capa de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Después del tiempo de incubación se agregó 300 µl de la solución de lisis recién preparada compuesta por NaOH 0.2N y SDS 1% (preparar 1ml: NaOH 2N: 100µl; SDS: 100µl y 800µl de agua destilada), agitando suavemente y se incubó durante 10 min. en hielo. La solución de lisis tiene la ocupación de romper la pared celular de los microorganismos ya que el NaOH, utilizado a una concentración de 2N, eleva el pH de la solución lítica a 12.5 desnaturalizando el DNA cromosómico pero no el plasmídico CCC; este efecto permite la eliminación de la mayor parte del DNA cromosómico del lisado celular. El SDS funciona como detergente iónico, el cual se une fuertemente a proteínas desnaturalizándolas irreversiblemente; sus propiedades no se alteran con las variaciones de pH.

Posteriormente se adicionó 200µl de una solución de acetato de potasio 5M (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial pH 4.8), mezclando ligeramente y se incubó 10 min. en hielo. El ácido acético neutraliza el pH, permitiendo que las hebras de DNA a renaturalizar. El acetato de potasio también precipita el SDS de la solución, junto con los restos celulares. A continuación se centrifugó durante 5 min. a temperatura ambiente (12000 rpm). En este paso las proteínas y restos celulares se precipitan pudiendo ser extraídas de manera sencilla. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a otro tubo (o con un palillo estéril se retira los restos celulares). Al sobrenadante se le adicionó 500µl de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 24:24:1, mezclando moderadamente. Se centrifugó durante 10 min. (12000 rpm).

Un paso clave en la purificación del DNA plasmídico, es la eliminación de proteínas, principalmente nucleasas; esto se logra por un procedimiento simple, la extracción con fenol y cloroformo desnaturaliza las proteínas y elimina a los lípidos y la adición de alcohol isoamílico evita la formación de espuma producida por el fenol. Al someter la muestra a centrifugación esta se separa en dos fases, en donde en fase acuosa se obtendrá el DNA plasmídico, pudiéndose encontrar una interfase la cual son restos de proteínas, y en la fase orgánica se encontrara el fenol, el cloroformo, el alcohol isoamílico y parte del RNA (si se requiere DNA muy puro, repetir este paso dos veces más).

A continuación se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregó 500µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, mezclando suavemente y se centrifugó durante 3min. (1200 rpm). En este paso se asegura la eliminación total del fenol. Posteriormente se transfirió la fase superior a otro tubo y se adicionó 1ml de etanol absoluto frío, incubando durante 20min. a -80°C o 1 hora a -20°C (en el congelador). Se centrifugó durante 15min. a temperatura ambiente (12000 rpm). Si no se cuenta con una ultracongeladora se puede dejar precipitando toda la noche en un congelador convencional.

En seguida se desechó el sobrenadante (con cuidado de no tirar la pastilla), lavando dos veces con 500µl de etanol al 70% centrifugando durante 3 min. entre cada lavado. Al lavar con etanol al 70% elimina cualquier soluto atrapado en el precipitado. Se dejó secar la pastilla (a 65°C) y se resuspendió en 50µl de agua desionizada estéril o agua HPLC (agua libre de nucleasas). Se agregó 5µl de RNAasa y se incubó a 37°C durante 30min.

La RNAasa degradara cualquier residuo de RNA. El DNA obtenido se puede almacenar a -20°C o correr en un gel de electroforesis.

Se utilizó la siguiente cepa control *E. coli* W3110 pACYC 184 para verificar la extracción de plásmidos y la restricción con las endonucleasas. Esta cepa es utilizada como vector ya que contienen plásmidos vacios (que no han sido alterados) y se tiene caracterizado el mapa de restricción

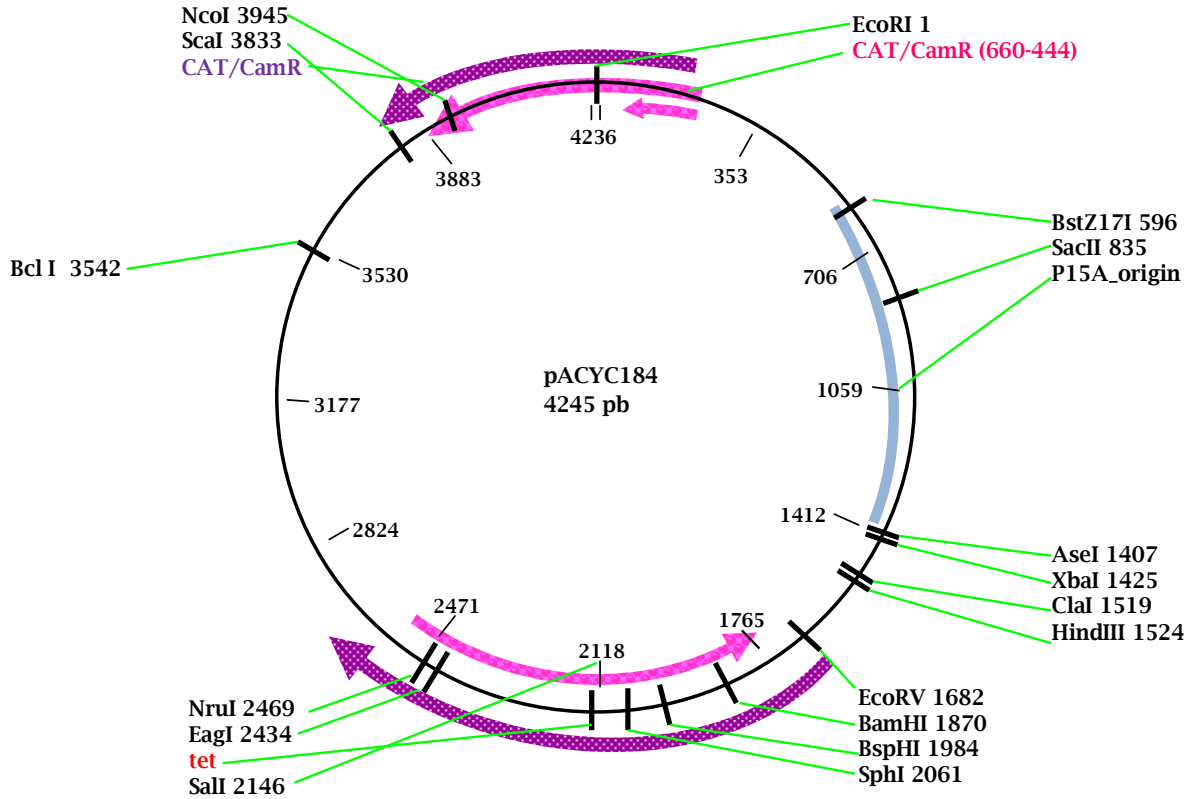


Figura 5. Mapa de restricción de W3110 pACYC 184 *E. coli* resistente a Cloramfenicol y Tetraciclina.

### 8.6.1 RFLP.

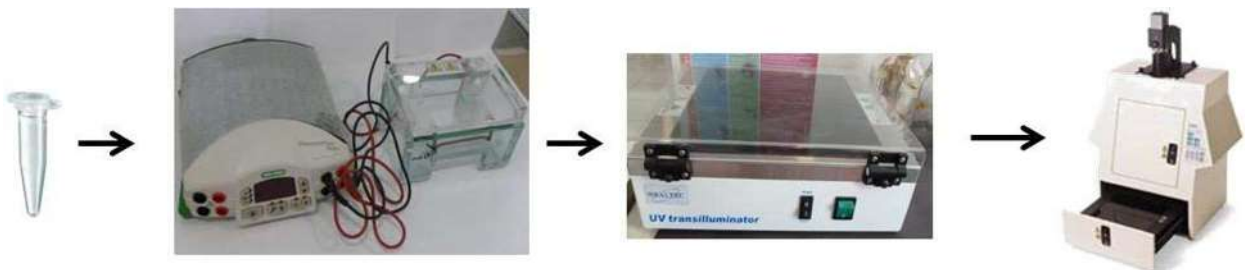
Se realizó una digestión del ADN extraído de las cepas que presentaron mayor concentración de plásmidos con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Hind* III a 37°C durante 4 h con la proporción que se muestra a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Condiciones de digestión.

<i>Eco</i> R I	<i>Hind</i> III
2 µL de Buffer	2 µL de Buffer
4 µL de Enzima	2 µL de Enzima
4 µL de DNA	5 µL de DNA
10 µL de H <sub>2</sub> O Libre de Nucleasas	11 µL de H <sub>2</sub> O Libre de Nucleasas

### 8.6.2. ELECTROFORESIS.

Se corrieron geles de agarosa al 1% en cámara de electroforesis a 100 Volts durante 1 h, se tiñeron los geles con Bromuro de etidio (al 0.5%) durante 25 min y estos fueron revelados con un transiluminador, las imágenes obtenidas fueron a través de un fotodocumentador.



**Figura 6.** Diagrama de electroforesis. Se corre la muestra de ADN plasmídico mediante electroforesis, se tiñe con bromuro de etidio y se observa en un transiluminador.



## 9. RESULTADOS.

### 9.1. PRUEBAS FENOTÍPICAS.

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características “observables” de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Bou, y otros, 2011).

En este estudio se ensayaron 26 pruebas en las cuales se puso de manifiesto algunas de las características de metabolismo bacteriano, que entran dentro de las pruebas fenotípicas ensayadas de los microorganismos utilizados. El resultado obtenido antes de la conservación sirvió para la confirmación de la identidad de las cepas bacterianas (Tabla 5); haciendo la comparativa después de 32 meses con el tratamiento de conservación se observa una reproducibilidad del 100%, con la única variación de la utilización de la Ramnosa en *Providencia rettgeri* al fermentarlo de manera lenta (Tabla 6).

**Tabla 5.** Ensayo de identidad antes de la conservación.

	Gram	Oxidasa	Catalasa	Lactosa	Glucosa	Acto sintético Gas	Lisina	Citrato	Fenilalanina	Movilidad	Indol	Oritina	Malonato	Rojo de metilo	Ureasa	Voges- Proskauer	Arabinosa	Inositol	Mentol	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Sorbitol	Trehalosa	Xilosa
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Listeria monocytogenes 2</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Listeria monocytogenes 3</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Paenibacillus alvei</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus coagulans</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus spp.</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus mycoides</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	N/E	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	N/E	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Positivo (+), Negativo (-), No ensayado N/E, Fermentación lenta +/50. A las 24h de incubación a 37°C.

VALORACIÓN DE LA ESTABILIDAD PLASMÍDICA EN CEPAS BACTERIANAS CONSERVADAS CON EL MÉTODO DE CONSERVACIÓN EN “SUELO MODIFICADO ESTÉRIL”.

**Tabla 6.** Ensayo de identidad después de 32 meses de conservación en “suelo estéril”.

	Gram	Oxidasa	Catalasa	Lactosa	Glucosa	sulfhídrico Gas	Lisina	Citrato	Fenilalanina	Movilidad	Indol	Orritina	Malonato	Rolo de melilo	Ureasa	Voges-Proskauer	Arabinosa	Inositol	Manitol	Rafinosa	Ramnosa	Sacarosa	Sorbitol	Trehalosa	Xilosa
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Listeria monocytogenes 2</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Listeria monocytogenes 3</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Paenibacillus alvei</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus spp.</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus mycoides</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	NE	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	NE	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

Positivo (+), Negativo (-), No ensayado **NE**, Fermentación lenta **+/50**. A las 24h de incubación a 37°C.



**Figura 7.** Ensayos de identidad. Pruebas bioquímicas realizadas después de 32 meses de conservación a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 9.2. VIABILIDAD.

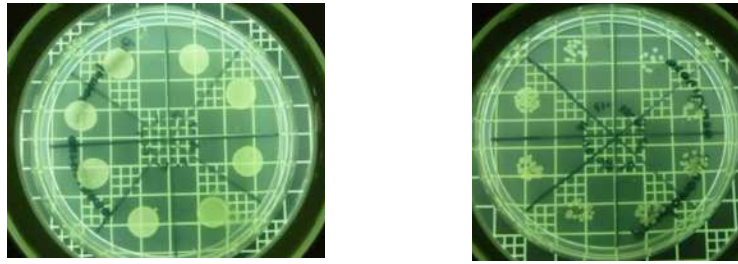
En un medio de conservación se busca por lo menos mantener la población inicial de microorganismos; cuando se utilizan medios de preservación que no mantiene inactivo el metabolismo de los microorganismos se corre el riesgo de que las bacterias consuman todos los nutrientes del medio y secreten desechos del propio metabolismo los cuales pueden inhibir a los microorganismos conservados.

Los datos obtenidos de la viabilidad después de 32 meses de conservación en suelo modificado estéril muestran como resultado en las cepas Gram positivas niveles de viabilidad  $10^1$ - $10^{16}$  UFC/ml y en las cepas Gram negativas niveles que oscilan entre  $10^2$ - $10^5$  UFC/ml, como lo muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Viabilidad por el método de Miles & Misra.

Cepas bacterianas conservadas	UFC/ml Después de 32 meses de conservación
<i>Listeria monocytogenes</i>	$1 \times 10^9$
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	$1 \times 10^8$
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	$1 \times 10^8$
<i>Paenibacillus alvei</i>	$15 \times 10^1$
<i>Bacillus coagulans</i>	$2 \times 10^3$
<i>Bacillus spp.</i>	$3 \times 10^3$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2 \times 10^{11}$
<i>Bacillus cereus</i>	$1 \times 10^4$
<i>Bacillus mycoides</i>	$1 \times 10^4$
<i>Bacillus megaterium</i>	$4 \times 10^{16}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$2 \times 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3 \times 10^3$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$2 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i>	$3 \times 10^2$
<i>Providencia stuartii</i>	$1 \times 10^4$
<i>Providencia rettgeri</i>	$3 \times 10^2$

Viabilidad después de 32 meses de la conservación con el método de “suelo modificado estéril” a temperatura ambiente.



**Figura. 8** Viabilidad de *P. aeruginosa* por el método de Miles-Misra después de 32 meses de conservación.

### 9.3. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Por medio del método propuesto por Kirby-Bauer (1938) se realizaron ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos a las cepas bacterianas antes y después de la conservación; los resultados obtenidos demuestran una estabilidad de las resistencias a diferentes antibióticos después de la conservación, esto se puso de manifiesto a través de la reducción de los halos de inhibición, únicamente una de las cepas conservadas perdió la resistencia a los antibióticos ensayados.

#### 9.3.1. Cepas Gram positivas.

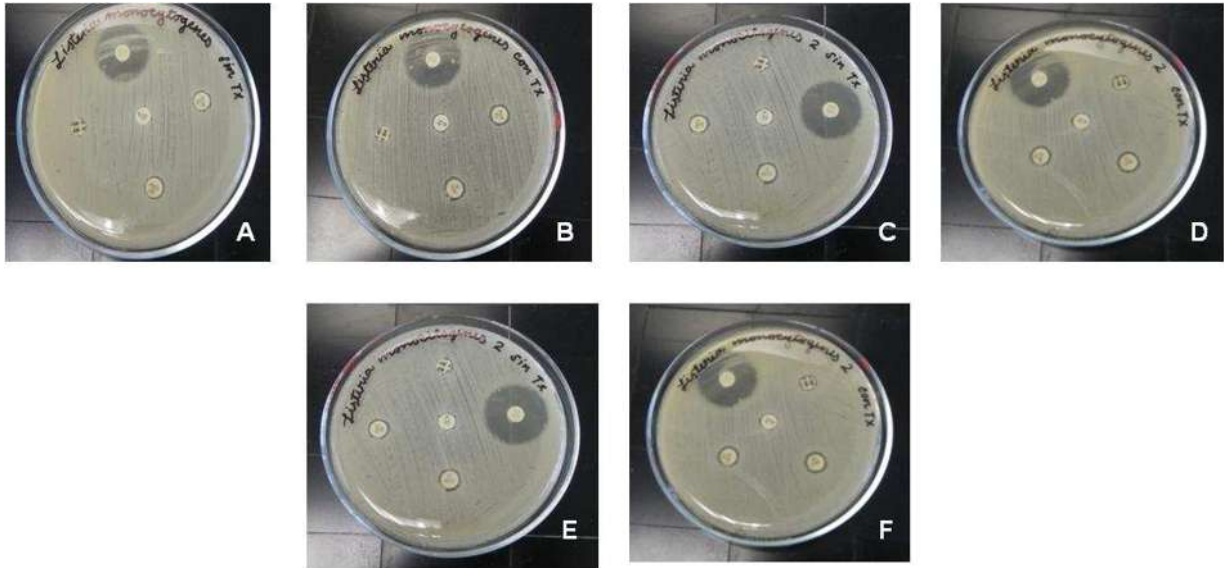
La envoltura celular de las bacterias Gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias (Milton, Salton, y Kim, 1996).

9.3.1.1. Familia *Listeriaceae*.

**Tabla 8.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Listeriaceae*.

Antibiótico		Ampicilina AM		Amoxicilina/Ac. clavulánico AMC-30		Ampicilina/Sulbactam SAM-20		Penicilina P-10		Piperacilina/Tazobactam TZP-110	
		Sin TX	Con	Sin TX	Con	Sin TX	Con	Sin TX	Con	Sin TX	Con
<i>Listeria monocytogenes</i>	Halos de inhibición (mm)	6	6	8	8	8	9	7	7	23	25
	Interpretación	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	Halos de inhibición (mm)	7	7	8	8	8	9	7	7	24	23
	Interpretación	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	Halos de inhibición (mm)	7	7	9	8	8	8	7	6	24	23
	Interpretación	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

R. Resistente, S. Sensible.



**Figura 9.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Listeriaceae*: (A) *Listeria monocytogenes* antibiograma antes de la conservación. (B) *Listeria monocytogenes* antibiograma después de la conservación. (C) *Listeria monocytogenes* (2) antibiograma antes de la conservación. (D) *Listeria monocytogenes* (2) antibiograma después de la conservación. (E) *Listeria monocytogenes* (3) antibiograma antes de la conservación. (F) *Listeria monocytogenes* (3) antibiograma después de la conservación.

El perfil de susceptibilidad de la Familia *Listeriaceae* dio como resultado en las tres cepas ensayadas resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam (Tabla 8). Sin mostrar cambios significativos después de 32 meses de conservación (Fig. 9).

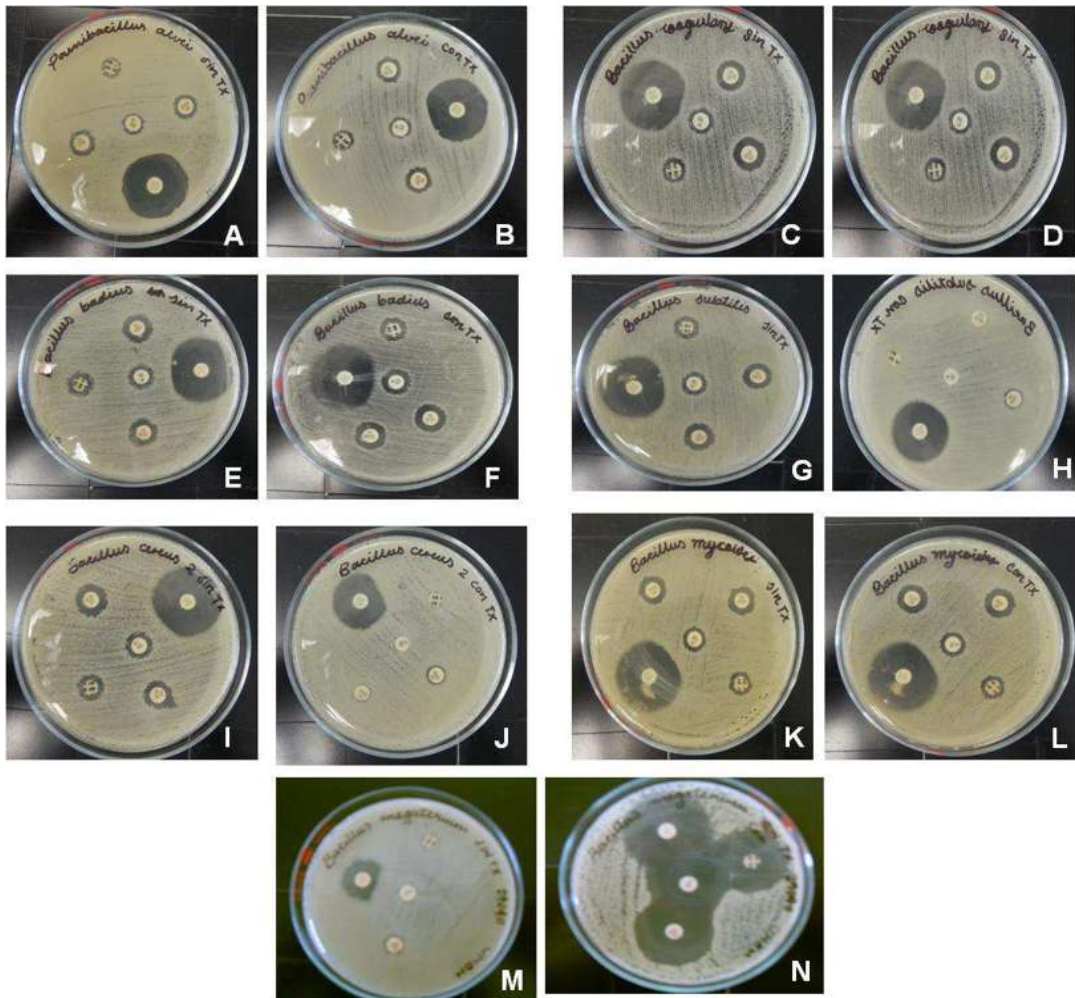
### 9.3.1.2. Familia *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae*.

**Tabla 9.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de las Familias *Paenibacillaceae* y *Bacillaceae*.

Antibiótico		Ampicilina AM		Amoxicilina/Ac. clavulanico AMC-30		Ampicilina/Sulbactam SAM-20		Penicilina P-10		Piperacilina/Tazobactam TZP-110	
		Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX
<i>Paenibacillus alvei</i>	Halos de inhibición (mm)	8	7	10	10	10	10	9	8	26	26
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus coagulans</i>	Halos de inhibición (mm)	9	7	12	10	10	10	9	8	26	26
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus spp.</i>	Halos de inhibición (mm)	10	10	12	13	11	13	9	11	28	30
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Halos de inhibición (mm)	10	6	11	7	11	6	9	6	28	25
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Halos de inhibición (mm)	10	6	13	7	11	6	11	6	28	23
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus mycoides</i>	Halos de inhibición (mm)	10	9	11	11	11	12	10	10	28	28
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<i>Bacillus megaterium</i>	Halos de inhibición (mm)	6	28	7	30	N/E	N/E	6	32	17	34
	<b>Interpretación</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>

R. Resistente, S. Sensible, N/E. No ensayado.





**Figura 10.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la familia *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae*: **(A)** *Paenibacillus alvei*, antibiograma antes de la conservación. **(B)** *Paenibacillus alvei*, antibiograma después de la conservación. **(C)** *Bacillus coagulans*, antibiograma antes de la conservación. **(D)** *Bacillus coagulans*, antibiograma después de la conservación. **(E)** *Bacillus spp.*, antibiograma antes de la conservación. **(F)** *Bacillus spp.*, antibiograma después de la conservación. **(G)** *Bacillus subtilis*, antibiograma antes de la conservación. **(H)** *Bacillus subtilis*, antibiograma después de la conservación. **(I)** *Bacillus cereus*, antibiograma antes de la conservación. **(J)** *Bacillus cereus*, antibiograma después de la conservación. **(K)** *Bacillus mycooides*, antibiograma antes de la conservación. **(L)** *Bacillus mycooides*, antibiograma después de la conservación. **(M)** *Bacillus megaterium*, antibiograma antes de la conservación. **(N)** *Bacillus megaterium*, antibiograma después de la conservación.

El perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de la Familia *Paenibacillaceae* mostró como resultado resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulánico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam; sin mostrar cambios significativos después de 32 meses de conservación. El resultado de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas bacterianas englobadas dentro de la familia *Bacillaceae* mostró el siguiente comportamiento:

*Bacillus coagulans* reveló resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam. *Bacillus spp.* mostró como resultado resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam; sin presentar cambios significativos después de 32 meses de conservación. *Bacillus subtilis* mostró resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam. El perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de *Bacillus cereus* mostró resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam; observándose una reducción de los halos de inhibición después de la conservación. *Bacillus mycoides* dio como resultado resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina/Sulbactam y Penicilina; y sensibilidad a Piperacilina/Tazobactam; sin mostrar cambios después de la conservación. El efecto de la conservación sobre *Bacillus megaterium* sobre el perfil de sensibilidad fue la pérdida de la resistencia a Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico y Penicilina. Haciendo la comparación del antes y el después de la conservación se observa una estabilidad de la respuesta a cada uno de los antibióticos ensayados en las cepas bacterianas (Tabla 9), mostrando algunos cambios sin importancia estadística (Fig. 10).

### 9.3.2. Cepas Gram negativas.

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas está compuesta por una membrana citoplasmática (membrana interna), una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Esta membrana externa protege a las bacterias de varios antibióticos, que normalmente dañarían la membrana interna o la pared celular de peptidoglicano. La membrana externa proporciona a estas bacterias resistencia a la lisozima y a la penicilina (Milton, Salton, y Kim, 1996)

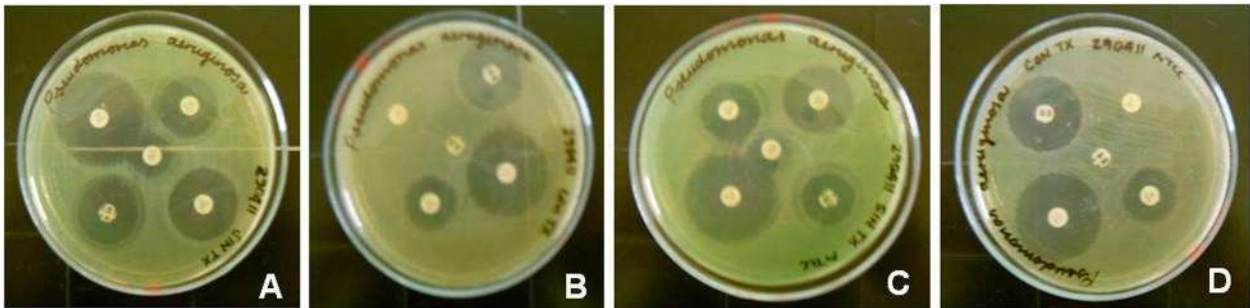


9.3.2.1. Familia *Pseudomonaceae*.

**Tabla 10.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Pseudomonaceae*.

Antibiótico	Cepa bacteriana	Resultado	Amikacina AN-30		Ampicilina/Sulbactam SAM-20		Carbenicilina CB-110		Cefotaxima CTX-30		Ceftazidima CAZ-30		Ceftriaxona CRO-30		Netilmicina NET-30		Tetraciclina TE-30		Piperacilina/Tazobactam TZP-110		Trimetropim TM-P-5	
			Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX	Sin TX	Con TX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Halos de inhibición (mm)		6	6	26	25	18	20	20	20	30	29	18	19	23	23	14	10	30	30	6	6
	Interpretación		R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Halos de inhibición (mm)		6	6	24	25	25	21	21	21	32	30	20	20	25	25	16	10	30	30	6	6
	Interpretación		R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R

R. Resistente, S. Sensible.



**Figura 11.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Pseudomonaceae*: (A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, antibiograma antes de la conservación. (B) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, antibiograma después de la conservación. (C) *Pseudomonas aeruginosa*, antibiograma antes de la conservación. (D) *Pseudomonas aeruginosa*, antibiograma después de la conservación.

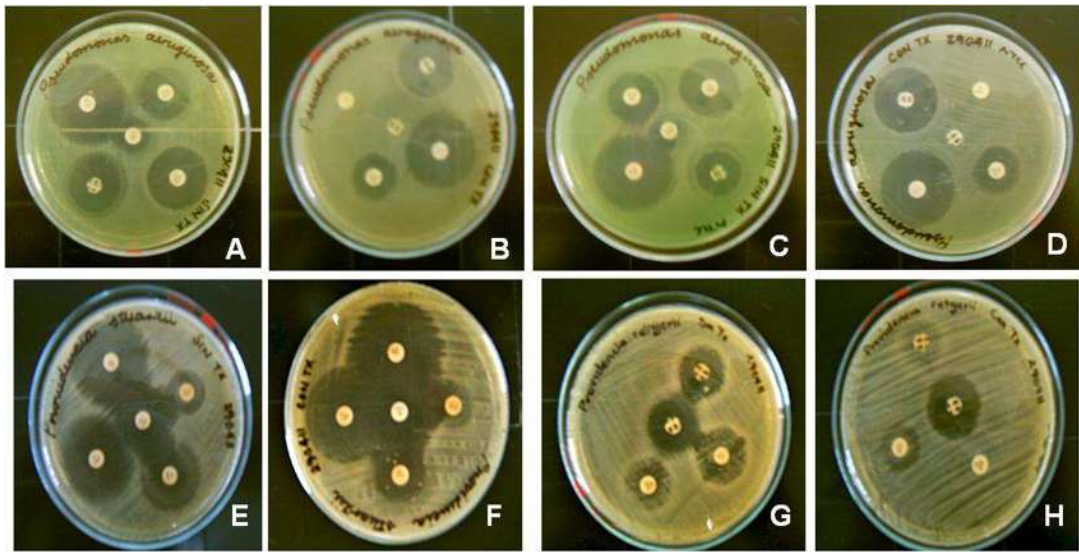
La susceptibilidad antimicrobiana de la Familia *Pseudomonaceae* dio como resultado resistencia a Cefotaxima y Trimetropim/Sulfametoxazole; siendo susceptible para Amikacina, Carbenicilina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Netilmicina, Piperacilina/Tazobactam y Tetraciclina; en ambas cepas de *P. aeruginosa* (Tabla 10). Observándose una ligera disminución en los halos de inhibición (Fig. 11)

9.3.2.2. Familia *Enterobacteriaceae*.

Tabla 11. Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Enterobacteriaceae*.

Antibiótico	Cepa bacteriana	Resultado	Amikacina AN-30		Amoxicilina/Ac. Clavulánico AMC-30		Ampicilina AM-10		Cefazolina CZ-30		Ceftazidima CAZ-30		Ceftriaxona CRO-30		Cefalotina CF-30		Cloramfenicol C-30		Fosfomicina FOS-200		Gentamicina GM-10		Netilmicina NET-30		Ofloxacina OFX-5		Tetraciclina TE-30		Ticarcilina/Ac. Clavulánico TIM-85		Trimetoprim TMP-5	
			Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con		
Escherichia coli ATCC 25922		Haus de inhibición (mm)	24	20	18	19	8	12	21	21	28	24	27	26	13	9	27	25	29	30	20	20	24	24	35	40	26	26	23	30	23	24
		Interpretación	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Escherichia coli		Haus de inhibición (mm)	22	21	15	16	6	6	21	18	32	30	30	30	15	15	6	6	30	33	15	13	16	16	20	18	6	6	23	23	6	6
		Interpretación	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	
Providencia stuartii		Haus de inhibición (mm)	25	18	6	6	6	6	6	6	6	6	30	26	6	6	24	23	16	10	22	20	30	30	32	28	16	16	33	33	19	
		Interpretación	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	
Providencia rettgeri		Haus de inhibición (mm)	21	21	NE	NE	15	6	11	6	14	6	30	28	11	6	17	20	19	16	21	20	24	24	28	30	16	16	35	35	30	
		Interpretación	S	S	..	..	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	

R: Resistente, S: Sensible, N/E: No ensayado.



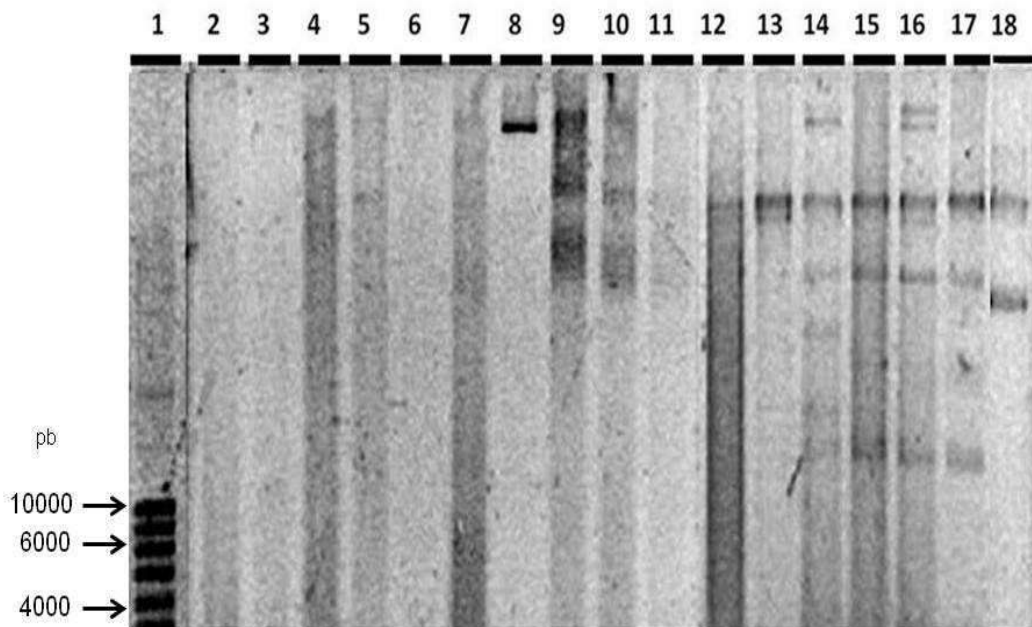
**Figura 12.** Pruebas de susceptibilidad por difusión en disco de la Familia *Enterobacteriaceae*: **(A)** *Escherichia coli* ATCC 25922, antibiograma antes de la conservación. **(B)** *Escherichia coli* ATCC 25922, antibiograma después de la conservación. **(C)** *Escherichia coli*, antibiograma antes de la conservación. **(D)** *Escherichia coli*, antibiograma después de la conservación. **(E)** *Providencia stuartii*, antibiograma antes de la conservación. **(F)** *Providencia stuartii*, antibiograma después de la conservación. **(G)** *Providencia rettgeri*, antibiograma antes de la conservación. **(H)** *Providencia rettgeri*, antibiograma después de la conservación.

En la Familia *Enterobacteriaceae* el perfil de sensibilidad mostró como resultado en las cepas de *E. coli* resistencia a los siguientes antibióticos: Ampicilina y Cefalotina, dando una sensibilidad a Amikacina, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Cefazolina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cloramfenicol, Fosfomicina, Gentamicina, Netilmicina, Ofloxacina, Tetraciclina, Ticarcilina/Ác. Clavulanico, Trimetropim (Tabla 10); observándose cambios en los halos de inhibición después de 32 meses de conservación (Fig. 12). En las cepas del género *Providencia* dio como resultado resistencia a los siguientes antibióticos: Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ác. Clavulanico, Ampicilina, Cefazolina, Cefalotina y Fosfomicina; dando como sensible a: Amikacina, Ceftazidima, Gentamicina, Netilmicina, Ofloxacina Ticarcilina/Ác. Clavulanico, Cloramfenicol, Tetraciclina y Trimetropim (Tabla 11). Observándose una reducción de los halos de inhibición después de 32 meses de conservación (Fig. 12).

#### 9.4. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Los plásmidos bacterianos son un recurso empleado en diversos sectores como lo es la industria farmacéutica o química se usan bacterias para producir sustancias de interés para el hombre, como por ejemplo insulina; industria alimentaria se usan bacterias para producir colorantes alimenticios o en Biología molecular como vectores; por mencionar algunas utilidades. Por lo anterior es de relevancia verificar la preservación de dicho material genético en tratamientos novedosos de conservación bacteriana.

A partir de cepas recién aisladas extraídas del método de conservación se realizó la extracción de ADN extracromosomal por lisis alcalina (ver materiales y métodos). El resultado de la extracción plasmídica (Fig. 13) mostró una preservación del 72.23% de la totalidad de plásmidos después de 32 meses de conservación (Fig. 14). Los plásmidos de las cepas Gram positivas mantuvieron en un 51.3%, mientras que las **Gram negativas conservaron el 100%** de los mismos (Fig. 15).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos bacterianos después de 32 meses de la conservación. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular de 1kb 2.- *L. monocytogenes*; 3.- *L. monocytogenes* 2; 4.- *L. monocytogenes* 3; 5.- *P. alvei*; 6.- *B. coagulans*; 7.- *Bacillus spp*; 8.- *B. subtilis*; 9.- *B. cereus*; 10.- *B. mycoides*; 11.- *B. megaterium*; 12.- *P. aeruginosa* ATCC 27853; 13.-*P. aeruginosa*; 14.- *E. coli* ATCC 25922; 15.- *E. coli*; 16.- *P. stuartii*; 17.- *P. rettgeri*; 18.- *E. coli* W3110 pACYC 184.



**Figura 14.** Porcentaje de conservación plasmídica después de 32 meses de conservación con el método en suelo modificado estéril.



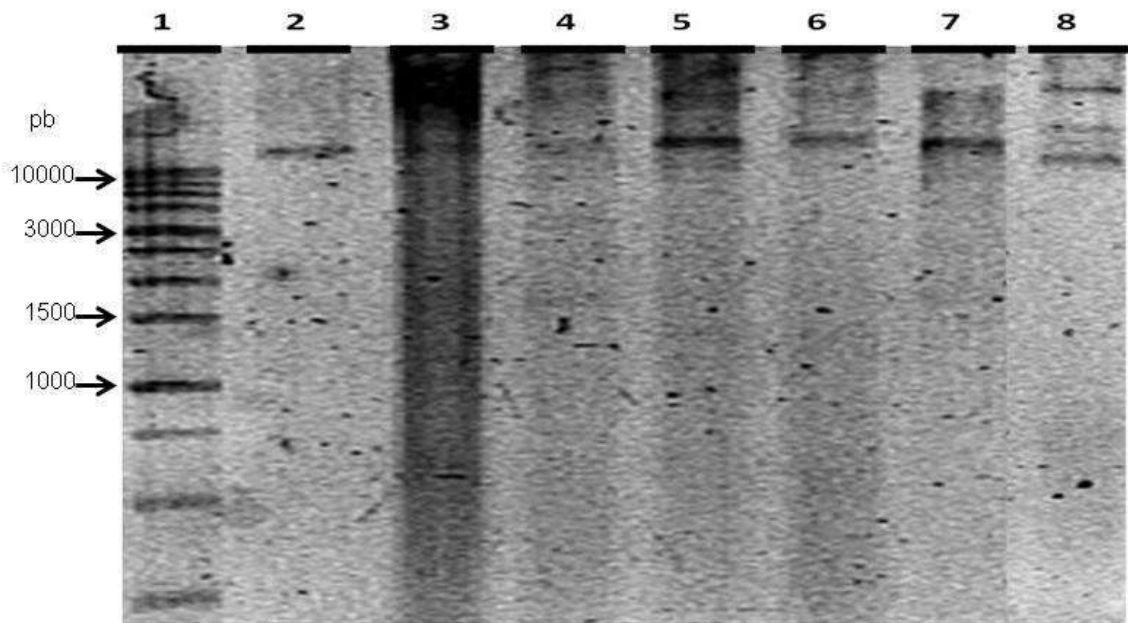
**Figura 15.** Porcentaje de conservación plasmídica. (A) Cepas Gram positivas. (B) Cepas Gram negativas. Después de 32 meses de conservación con el método en suelo modificado estéril.



## 9.5. RFLP.

Como análisis preliminar de los plásmidos que se encontraron en mayor concentración y usando la cepa control se realizó un análisis mediante enzimas de restricción, para este ensayo en particular se utilizaron las endonucleasas *EcoR* I y *Hind* III; estas enzimas fueron elegidas por que poseen dianas de restricción comunes, por lo tanto es más probable obtener cortes con estas enzimas.

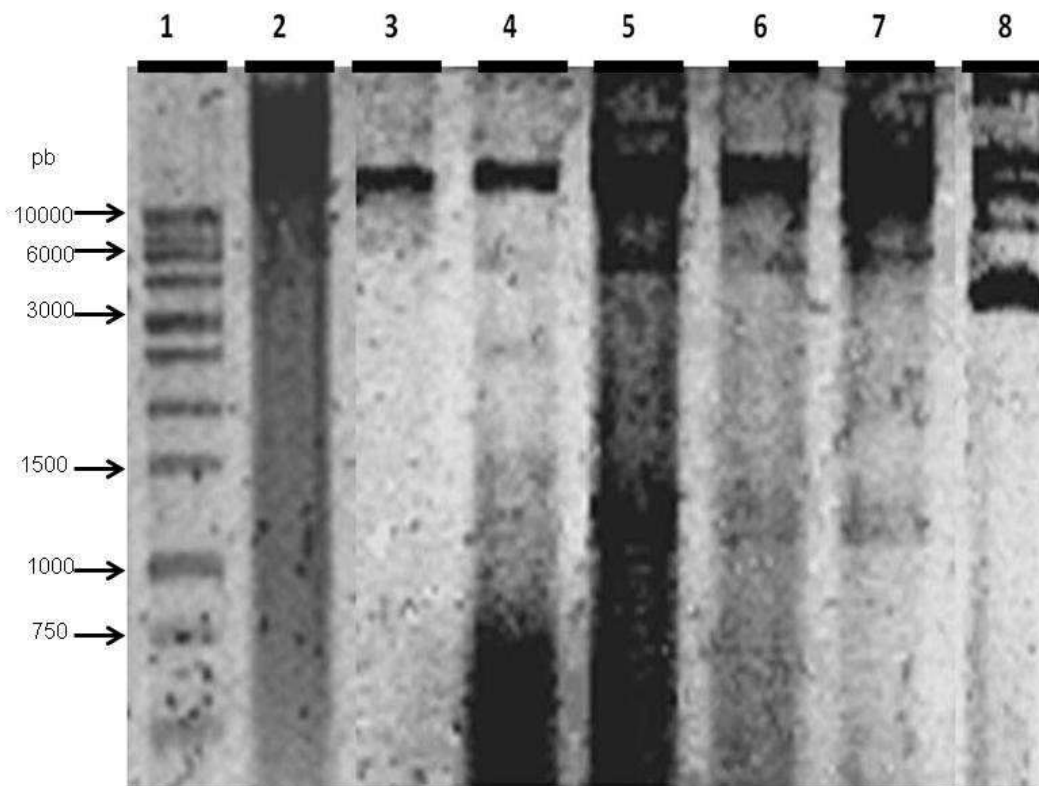
El resultado de la digestión del DNA plasmídico y la endonucleasas *EcoR* I mostró en la mayoría de los casos dos cortes, los cuales se presentaron cortes mayores las 10,000 pb; el cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 no se observaron cortes. La cepa que se utilizó como control (*E. coli* W3110 *pACYC 184*) mostró 3 cortes hechos por la enzima (Figura 16).



**Figura 16.** Restricción con la enzima *EcoR* I. Análisis electroforético, carriles: 1.- Marcador de peso molecular de 1 Kb; 2.- *P. aeruginosa* ATCC 27853; 3.- *P. aeruginosa*; 4.- *E. coli* ATCC 25922; 5.- *E. coli*; 6.- *P. stuartii*; 7.- *P. rettgeri*; 8.- *E. coli* W3110 *pACYC 184*.

Los resultados obtenidos con la enzima *Hind* III mostró una mayor actividad al presentarse un número mayor de cortes en las cepas ensayadas. También se observó la ausencia de cortes en las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa*.

El tamaño de los cortes varían entre por encima de la 10,000 pb; así como también se encontraron cortes en las 6,000; 4,000; 2,500; 1,500 y 1,100 pares de bases. (Figura 17).



**Figura 17.** Restricción con la enzima *Hind* III. Análisis electroforético, carriles: 1.- Marcador de peso molecular de 1 Kb; 2.- *P. aeruginosa* ATCC 27853; 3.-*P. aeruginosa*; 4.- *E. coli* ATCC 25922; 5.- *E. coli*; 6.- *P. stuartii*; 7.- *P. rettgeri*; 8.- *E. coli* W3110 pACYC 184.

## 10. DISCUSIÓN.

El método de conservación en suelo se ha empleado principalmente para la conservación de microorganismos capaces de producir esporas como lo son algunos bacilos y hongos (Weng, y col, 2005) debido a la baja cantidad de agua presente una vez seco el medio y la gran cantidad de nutrientes que contiene. El uso de un soporte inerte como lo es el mineral “perlita” permite la conservación de otros géneros bacterianos, debido que es un material muy poroso el cual retiene grandes cantidades de agua por lo que proporciona un ambiente adecuado para dichas bacterias aunque es limitado ya que no contiene ningún nutriente (Fages, 1990). El sistema desarrollado por Domínguez y col. 2010 contiene estos dos materiales en conjunto, por lo que da un soporte ideal para bacterias de diferentes géneros debido a la composición del medio, el cual es abundante en carbono como mineral y compuestos nitrogenados; la fuente de carbono se emplea por los microorganismos como detoxificante, es decir que “limpia” los desechos del metabolismo bacteriano, evitando así que se acumulen y conviertan al medio en tóxico para ellas, a su vez, los compuestos nitrogenados son utilizados como fuente de nitrógeno.

La evaluación de la eficacia de los métodos de conservación se determina por medio de la viabilidad, pureza, estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética (Parra, y col, 2006). Para la valoración del método de conservación en suelo modificado estéril a temperatura ambiente se empleó un esquema de recuperación para evitar contaminación con otras cepas utilizando astillas de madera, ya que el empleo de asas bacteriológicas puede causar contaminaciones cruzadas cuando son recuperadas deferentes cepas empleando la misma asa. Como parte del seguimiento de la estabilidad fenotípica se realizaron ensayos de identidad y pureza; dando como resultado el 100% de la reproducibilidad (Tablas 5 y 6); por lo que se puede decir que el método de conservación en “suelo modificado estéril” mantiene sin cambios después de 32 meses de conservación las características metabólicas, esto es debido a que las bacterias se mantienen con un metabolismo reducido el cual favorece al evitar cambios y alteraciones como podrían ser variaciones en el pH, metabolitos secundarios tóxicos para las mismas bacterias, entre otros.



De acuerdo a lo planteado por Weng, Díaz y Álvarez en 2005, se dice que un método de conservación debe garantizar la supervivencia de por lo menos el 70% de las células al realizar el método de Miles & Misra modificado. En el presente trabajo se comprobó que este porcentaje se vio superado al obtener en las Gram negativas una viabilidad hasta  $10^5$  ufc/ml y en las cepas Gram positivas hasta un  $10^{16}$  ufc/ml (Ver Tabla 7); por lo que se considera que el periodo de vida de una cepa conservada en un vial con “suelo modificado estéril” puede alcanzar un periodo de conservación a largo plazo, ya que se han venido recuperando sin problema, tomando en cuenta de que la cantidad de muestra inoculada en la primera dilución es menor a los 0.01gr aproximadamente.

Según Fernández, Andreu *et. al.* cuando se habla de minimizar al máximo el riesgo de cambio genético se recomienda emplear técnicas de conservación que detienen el crecimiento de las células manteniéndolas estables, debido a que se presume evitan la aparición de generaciones sucesivas, garantizando mayor estabilidad genética; por lo que el punto central de esta investigación fue la demostración de la estabilidad genotípica por medio de la preservación de plásmidos que confieren resistencia a antimicrobianos, el cual se puso de manifiesto a través de la susceptibilidad a antibióticos por el método de difusión en disco, observándose que en el 62.5% de las cepas no manifestaron cambios, el 25% perdieron la resistencia a antimicrobianos y el 12.5% mostraron una reducción de los halos de inhibición comparándolos con los diámetros medidos antes de conservar las cepas bacterianas; esto indica que el método de conservación aun sin contar con una presión selectiva mantiene las características de resistencia a antibióticos debido a que las condiciones del medio disminuye la aparición de generaciones sucesivas y por consiguiente evitan la modificación de las cepas conservadas por esta metodología.

Por lo anterior, y tomando en cuenta lo que dice Galen, James E. en 2007, un medio para estabilizar plásmidos que confieren resistencia a antimicrobianos y evitar que los pierdan debe de contar con antibióticos; se realizó la extracción del material extracromosomal mediante lisis alcalina para cuantificar después de 32 meses de conservación los plásmidos presentes obteniendo un rendimiento del 51% en las cepas Gram positivas y un **100% en las Gram negativas** (Véase Fig. 15); de acuerdo a estos resultados el método de conservación en suelo modificado estéril proporciona un medio propicio para mantener las características genotípicas de las 16 cepas bacterianas conservadas con este método; en el caso particular de las cepas Gram positivas, en las cuales se observó

una pérdida aparente del 49% puede estar dado a que dichos plásmidos se encuentren en muy bajo número de copias, en Jensen, y otros "Molecular Microbiol", se dice que en la naturaleza, los plásmidos bacterianos a menudo se mantienen de forma estable, incluso aunque estén presentes habitualmente en números de copias muy bajos. La herencia estable de plásmidos de bajo número de copias de origen natural puede depender de la presencia de ciertos sistemas genéticos que evitan activamente la aparición de una progenie libre de plásmidos, por lo anterior, y de acuerdo a las características del medio de conservación el cual simula ciertas condiciones en las que se pueden encontrar las bacterias en la naturaleza, dando así una explicación en la disminución de plásmidos sin que hayan perdido la resistencia a los antimicrobianos; con la excepción de la cepa *B. megaterium* la cual se vio afectada después de la conservación (Ver Tabla.9 y Fig.10 ).

Con el fin de analizar los plásmidos encontrados en las cepas conservadas se utilizó un tratamiento mediante enzimas de restricción utilizando las endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Hind* III dando como resultado un mapa de restricción, el cual podría ayudar a caracterizar en gran medida algunos de los plásmidos que las bacterias contiene. Se utilizó como control la cepa de referencia *E. coli* W3110 *pACYC 184*; la cual contiene un plásmido ya caracterizado; este plásmido tiene un solo sitio de corte para *EcoR* I (Véase Fig.5), el resultado de la electroforesis muestran diversos cortes por encima de la 10,000 pb (Fig. 16). En el caso de *Hind* III también presenta un solo sitio de corte en este plásmido, los cortes que presentaron fueron entre las 10,000 a las 3,000 pb (Fig.17); esto nos demuestra tanto la calidad de las enzimas de restricción así como las condiciones de digestión. Por lo tanto al analizar los resultados los plásmidos de las cepas conservadas tratados con estas enzimas de restricción podemos determinar que existen sitios de reconocimiento para dichos plásmidos, observándose diversos cortes en la electroforesis; con una mayor frecuencia con la endonucleasa de restricción *Hind* III.

## 11. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados y discusiones se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Este método de conservación garantiza la recuperación de las cepas con una viabilidad adecuada.
2. El método de conservación en suelo estéril a temperatura ambiente es apropiado para la preservación de géneros bacterianos que se requiera mantener intactas las propiedades metabólicas, así como también, sus características macro y microscópicas.
3. Esta metodología mantiene en gran medida las propiedades de resistencia a antibióticos, por lo que se pudiera emplear como método de conservación de rutina para cepas bacterianas con este tipo de características.
4. Las cepas bacterianas Gram negativas son las que mantienen al 100% sus características tanto fenotípicas como genotípicas; Gram positivas conservan sus propiedades en un 85%, por lo que se puede concluir que en las cepas Gram positivas el tiempo de preservación con este método es limitado
5. El método de conservación en “suelo modificado estéril” es un método estable en la conservación a largo plazo de cepas bacterianas y que puede ser aplicado como un método de conservación de rutina para laboratorios que deseen hacer uso de estas características genotípicas.

6. Se obtuvo una huella por medio de las enzimas de restricción empleadas, las cuales proporcionan una caracterización primaria de los plásmidos conservados.

## **12. PERSPECTIVAS.**

1. Realizar ensayos futuros con las enzimas de restricción empleadas en este trabajo con el fin de caracterizar los plásmidos contenidos en las cepas conservadas en suelo modificado estéril.
2. Determinar por medio de microscopia electrónica de barrido en donde se ubican las bacterias en el medio de conservación.
3. Estudiar el origen de la resistencia a antibióticos mediante el curado de plásmidos.
4. Continuar monitoreando las condiciones fenotípicas y genotípicas de las 16 cepas bacterianas preservadas para conocer el alcance de esta metodología.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Achtman, M., & Skurray, R. (1977). A redefinition of the mating phenomenon in bacteria. *Microbial Interactions*, 233-279.
- Alonso, O. M., Zavala, T. O., & Pedroza, R. C. (2007). Expresión de anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) contra *Helicobacter pylori* en la levadura *Pichia pastoris*. *Rev Biomed*, 168-174.
- Arencibia, A. D., & Rosario, F. L. (2003). Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. *Retel*, 19-39.
- Barbosa, G., & Vega, H. (2000). *Deshidratación de alimentos*. Zaragoza: Acriba.
- Bauer, A. W., Kirby, M., Sherris, J., & Turck, M. (1938). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Clin. Pathol*, 493-496.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 8-60.
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 166-168.
- Caballero, R. J., Moyano, E., & Muñoz, B. J. (2010). Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo en gel de agarosa. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 50-56.
- Chater, K. F., Stanley, G., Calam, C. T., Manchee, R. J., Evans, C. G., & Robinson, A. (1999). *The stability of industrial organisms*. Kew Edition.

- Chung, C. T., & Mieller, R. H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cell. *Nucleic Acids Research*, 3580.
- Daza, P. R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 57-67.
- Del Puerto, C. A., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocado, M. D., Carnota, G., y otros. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *VacciMonitor*, 20-24.
- Fages, J. (1990). An optimized process for manufacturing an *Azospirillum inoculant* for crops. *Appl Microbiol Biotechnol*, 473-478.
- Faría, J., Rivero, Z., Gallego, B., & Allara, M. (1999). Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNFNG aislados en leche cruda (II). *FCV-LUZ*, 11-16.
- Fernández, E., & Fernández, L. O. (1997). Conservación de cepas de *Bacillus thuringiensis* durante 14 años en suelo estéril. Seminario científico internacional de sanidad vegetal; Palacio de las convenciones (págs. 20-34). La Habana: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.
- Galen, J., & E. (2007). Sistema de estabilización de plásmidos para el suministro de antígenos. *Oficina española de patentes y marcas*, 1-97.
- García, M. D., & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *SEM*, 12-16.
- García, P. L., Sureiro, R. A., & Garrido, M. J. (2000). Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. Xª Reunión científica de la sociedad Española de mutagénesis ambiental, (pág. 109). Madrid.

- Gherna, R. L. (1998). Preservation culture. Methods for general and molecular bacteriology. Washington: Bacteriologic Assays.
- Gonzáles, R. A., Montes de Oca, M. N., Riverón, Y., & Núñez, A. (2010). Aseguramiento de la calidad en las colecciones de cultivos microbianos. CENSA, 1-30.
- González A., P. (2002). Antibiograma por método de difusión: Selección de antimicrobianos. Rev Chil Infect, 82-84.
- Hill, L. R. (2000). Living Resources for Biotechnology. Cambridge: Cambridge Edition.
- Hosseini, J. N., Omrani, D. M., Sabahi, Z., Mosavi, M., & Minoos, Z. (2008). Plasmid profiling of *Klebsiella sp.* and its relation with antibiotic resistance in two hospitals of Urmia (Iran). Journal of Applied Sciences, 2781-2784.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology, 205-229.
- Chuysen, J. M., et al. (1994). Bacterial Cell Wall. Texas: Elsevier.
- Karbasizadeh, V., Badami, N., & Emtiazi, G. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. African Journal of Biotechnology, 379-383.
- Kojic, M., Vujcic, M., & Banina, A. (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactococcus casei* CG11, isolated from cheese. Applied and Environmental Microbiology, 4086-4088.
- Koneman, E., Allen, S., & Schreckenberger, P. (2001). Diagnóstico Microbiológico (Quinta edición ed.). Washington: Médica Panamericana.

- Llop, A., Fernández, C., Moliner, L., Otero, A., Alfonso, M., Iglesias, E., y otros. (1998). Colecciones de organismos biológicos típicos y biomoléculas relacionadas. Cuba: Informe presentado al Frente Biológico.
- Lodish, H. F. (2003). Molecular cell biology. New York: Freeman and Co.
- MacFarland, J. (1907). The nephelometer: on instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J. Am. Med. Assoc, 1176-1178.
- Malik, K. A. (1996). Technical information for culture collections curators in developing countries. Braunschweig: Education Committee Edit.
- Martínez, J. A., & Sánchez, F. (2007). Mecanismo de acción de los antibióticos. JANO, 28-34.
- Meza, R., Monroy, A., Mercado, M., Poutou, R., Rodríguez, P., & Pedroza, A. (2004). Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. Universitas Scientiarum, 35-42.
- Milton, R. J., Salton, & Kim, K. (1996). Medical Microbiology. Texas: Baron S.
- Morales, G. Y., Duque, E., Rodríguez, A. O., de la Torre, J., Martínez, C. R., Pérez, y. T., y otros. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. BioTecnología, 11-19.
- Navascués, O. C. (2006). Identificación de genes implicados y detección y purificación de autoinductores. Granada: Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos.



- Negrete, R. P., Romero, J. J., & Arredondo, F. J. (2004). Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Vet. Méx*, 21-30.
- Parra, H. S., Pérez, C. M., Bernal, M. M., Suárez, M. Z., & Montoya, C. D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *NOVA*, 1-116.
- Pérez, R. D., & Sosa, E. A. (2010). Evaluación de la tolerancia a la criopreservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor*, 11-17.
- Perry, S. F. (1995). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Methods Mol*, 21-30.
- Ramírez, M. S., Merkier, A. K., Quiroga, M. P., & Centrón, D. (2011). *Acinetobacter baumannii* is able to gain and maintain a plasmid harbouring In35 found in *Enterobacteriaceae* isolates from Argentina. *Springer*, 1-3.
- Ramírez, M. S., Morales, A., Vilacoba, E., Marquéz, C., & Centrón, D. (2011). Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) Clones of *Acinetobacter baumannii*. *Springer*, 1-4.
- Ramírez, M., Valdés, N., Bravo, L., Fernández, A., & Castañeda, N. (2004). Perfil plasmídico y resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. *Rev. Cubana Med*, 178-85.
- Sharma, B., & Smith, D. (2000). Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19-517.

- Slac, M. P., & Wheldo, D. B. (1978). A simple and safe volumetric alternative to the method of Miles and Misra, Irwin for counting viable bacteria. *MED. MICROBIOL.*, 541-545.
- Smith, D., & Onions, A. H. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi*. Wallingford: CAB international.
- Snell, J. J., & Kocur, M. (1991). *Maintenance of bacteria in gelatin disc*. London: 51-56.
- Soria, H. R. (2010). *Conservación de cepas de importancia clínica, ecológica y en alimentos. Un método alternativo, eficaz, sencillo y económico*. Morelia: UMSNH.
- Stoycheva, T., Venkov, P., & Tsvetkov, T. (2007). Mutagenic effect of freezing on mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, 243-250.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de infetología*, 217-226.
- Weng, A. Z., Díaz, R. O., & Álvarez, M. I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 43-47.
- Weng, A. Z., Junco, D., R., & Díaz, R. O. (2003). Evaluación de medio semisólido para la conservación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae. *Rev. Cubana Med*, 210-212.
- Weng, Z., Junco, D., R., Díaz, O. E., Álvarez, I., Beltrán, J. R., & Rodríguez, M. C. (2005). Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Cubana Higiene y Epid.*, 1-8.
- Youell, J., & Firman, K. (2008). EcoR 124I: Form plasmid-encoded restriction-modification system to nanodevice. *Microbiology and Molecular Biology*, 365-377.

- Youell, J., & Firman, K. (s.f.). *EcoR124I*: FROM.
- Zhou, Q., Wang, L., Yin, X., Feng, X., Shang, J., & Luo, Q. (2011). SigB-Dependent Tolerance to Protein Synthesis-Inhibiting Antibiotics in *Listeria monocytogenes* EGDe. Springer Science+Business Media, 1-8.

## 14. ANEXOS.

### Anexo 1. Caldo Luria Bertani.

Sustrato	Cantidad (g)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
pH 7	
Formula para 1,000 ml	

### Anexo 2. Orange G.

10x	
Sustrato	Cantidad
Glicerol	30%
Orange G	100 mg
Cbp H <sub>2</sub> O	50 ml

6x	
Sustrato	Cantidad
<b>Orange G</b>	0.35 g
Glicerol	3 ml
Cbp H <sub>2</sub> O	10 ml

**Anexo 3. DIÁMETROS DE REFERENCIA DE LA CLSI.**

Agente antimicrobiano	Zona de diámetros interpretativos estándares (mm)			Zona de control diámetros límites (mm)	
	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<b>Amikacina AN-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤15	—	≥16	19-26	18-26
<b>Amoxicilina/Ac. Clavulanico AmC-30</b> <i>Enterobacteriaceae</i>	≤13	14-17	≥18	18-24	—
<b>Ampicilina AM-10</b> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>L. monocytogenes</i>	≤13 ≤19	14-16 —	≥17 ≥20	16-22	—
<b>Ampicilina/Sulbactam SAM-20</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤11	12-14	≥15	19-24	—
<b>Carbeniilina CB-100</b> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	≤19 ≤13	20-22 14-16	≥23 ≥17	23-29	18-24
<b>Cefazolina CZ-30</b> <i>Enterobacteriaceae</i>	≤14	15-17	≥18	21-27	—
<b>Cefotaxima CTX-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤14	15-22	≥23	29-35	18-22
<b>Ceftazidima CAZ-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤14	15-17	≥18	25-32	22-29
<b>Ceftriaxona CRO-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤13	14-20	≥20	29-35	17-23
<b>Cefalotina CF-30</b> <i>Enterobacteriaceae</i>	≤14	15-17	≥18	15-21	—
<b>Cloramfenicol C-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤12	13-17	≥18	21-27	—
<b>Fosfomicina FOS-200</b> <i>E. coli</i>	≤12	13-15	≥16	22-30	—
<b>Gentamicina GM-10</b>	≤12	13-14	≥15	19-26	16-21

VALORACIÓN DE LA ESTABILIDAD PLASMÍDICA EN CEPAS BACTERIANAS CONSERVADAS CON EL MÉTODO DE CONSERVACIÓN EN “SUELO MODIFICADO ESTÉRIL”.

<i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>					
<b>Netilmicina NET-30</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤12	13-14	≥15	22-30	17-23
<b>Ofloxacina OFX-5</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤12	13-15	≥16	29-33	17-21
<b>Penicilina P-10</b> <i>L. monocytogenes</i>	≤19	20-27	≥28	—	—
<b>Piperacilina/Tazobactam TZP-110</b> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	≤17 ≤17	18-20 —	≥21 ≥18	24-30	25-33
<b>Ticarcilina/Ac. Clavulanico TIM-85</b> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	≤14 ≤14	15-19 —	≥20 ≥15	24-30	20-28
<b>Trimetropim TMP-5</b> <i>Enterobacteriaceae</i>	≤10	11-15	≥16	21-28	—
<b>Trimetropim/Sulfametoxazole SXT</b> <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa</i>	≤10	11-15	≥16	23-29	—

(Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966)