

Conservación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PSS en tierra de jardín y agua destilada estéril

Meinardo Lafargue-Gámez*, Aidín Martínez-Sánchez, Gisela De Armas-García, Gisela González-Pardo, Camila Rojas-Coss

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Vía Blanca, No. 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba

* meinardo.lafargue@icidca.edu.cu

RESUMEN

Introducción. Numerosos métodos de conservación se han utilizado para el mantener la Colección de Cultivos Microbianos del ICIDCA.

Objetivo. Garantizar la estabilidad y conservación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PSS, perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del ICIDCA, para producir GLUTICID®; fungicida biológico ampliamente utilizado en la agricultura.

Materiales y métodos. Se muestran los resultados de dos métodos de conservación: agua destilada estéril y tierra de jardín estéril, reportados en la literatura como métodos sencillos, económicos y que han permitido conservar el microorganismo por 20 años.

Resultados y discusión. Valores de diferencia en concentración de células viables siempre inferiores cuatro unidades logarítmicas ($4 < \log(\text{UFC/ml})$) para el mayor tiempo de estudio de estabilidad, con relación al tiempo inicial de conservación, avalan la efectividad de ambos métodos. Se lograron definir, además, para ambos métodos, asociaciones entre concentración de viables y tiempo en estudio, que ajustaron de manera óptima ($R^2 > 0.94$, en ambos casos).

Conclusiones. El método de conservación en agua destilada estéril evidenció los mejores resultados.

Palabras clave. Métodos de conservación, *Pseudomonas aeruginosa*, estabilidad en agua destilada, estabilidad en tierra de jardín.

ABSTRACT

Introduction. Several conservation methods have been used to maintain the Microbial Culture Collection at ICIDCA.

Objective. To ensure the stability and conservation of the strain *Pseudomonas aeruginosa* PSS, from the Microbial Culture Collection at ICIDCA to produce GLUTICID®; highly biological fungicide in agriculture.

Materials and methods. The results of two conservation methods are shown: sterile distilled water and sterile garden soil, reported in the literature as simple and economical methods that have allowed the conservation of the microorganism for 20 years.

Results and discussion. Difference values in concentration of viable cells always less than 4 logarithmic units ($4 < \log(\text{UFC/ml})$) for the longest stability study time in relation to the initial conservation time, support the effectiveness of both methods. It was also possible to define for both methods, associations between the conservation of viable products and the study time, which adjusted optimally ($R^2 > 0.94$, in both cases).

Conclusions. Sterile distilled water method show the best results.

Keywords. Conservation methods, *Pseudomonas aeruginosa*, stability using distilled water, stability using soil garden

INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos ha sido esencial para establecer la solución de múltiples problemas de la humanidad, los cuales pueden presentarse en campos tan diversos como la agricultura, la alimentación de los pueblos, la salud (animal y humana), la búsqueda de nuevas fuentes de energía y la conservación del medioambiente (1). Entonces, los microorganismos constituyen la fuente del material básico para el desarrollo de medicamentos, la introducción de agentes agroquímicos, el mejoramiento de biocontroladores, la elaboración de cosméticos y la confección productos industriales (1 - 3). Por lo antes mencionado, el creciente uso de bacterias, levaduras y hongos en diferentes esferas ha potenciado la necesidad de mantener los cultivos microbianos, de tal manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables (2 - 5).

Una gran variedad de métodos de conservación de microorganismos se han empleado (con un marcado desarrollo en el último medio siglo), estos métodos deben considerar las recomendaciones de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés). Las guías generales de dicha federación enuncian como principio minimizar la probabilidad de la pérdida de las características fisiológicas de las cepas conservadas, así como evitar mutaciones en ellas; estas deben mantenerse por, al menos, dos procedimientos diferentes (5, 6). En general, existen tres categorías que agrupan los métodos de conservación (basadas en el tiempo en que las células conservadas permanecen viables), que se definen como variantes de mantenimiento a corto, mediano y largo plazos (6).

El ICIDCA cuenta con una Colección de Cultivos Microbianos, con un gran número de microorganismos que han constituido el material imprescindible para establecer el desarrollo de investigaciones en diversas ramas, tales como la modificación del material genético de células, el desarrollo de estimuladores del crecimiento vegetal, la elaboración de alimento animal, la producción de alcohol y el mejoramiento del medioambiente (2, 5, 7, 8). Del mismo modo, estas investigaciones (con el empleo de diversas cepas microbianas) han permitido la introducción de microorganismos como soporte de diversos procesos tecnológicos (2, 5, 8).

Debe mencionarse, además, que los microorganismos conservados se han empleado como el necesario elemento que permite establecer la transferencia de tecnologías, desde el ICIDCA hacia varios centros que demandan el saber hacer, asociado a procesos que emplean cepas microbianas pertenecientes a la colección del Instituto. De ahí la importancia de la imprescindible conservación de microorganismos, que garanticen el ulterior empleo de estos en las diversas aplicaciones antes descritas; por ello, el objetivo de este trabajo es definir si la conservación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS, con el empleo de dos métodos diferentes, permite establecer niveles de viabilidad de dicha bacteria, para su posterior uso como productora de GLUTICID®; (importante fungicida biológico).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó como microorganismo la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS, que se conservaba en forma de preparado liofilizado (0.5 ml de liofilizado por frasco). Con la reconstitución de cada frasco liofilizado, con 1 ml de agua destilada estéril, se obtuvo una concentración de 2.5×10^{10} UFC/ml, a partir de la cual se prepararon las dos variantes de conservación, con la metodología que aquí se describirá.

Preparación de los frascos e inoculación en tierra estéril

Se adicionaron 6 g de tierra de jardín en frascos de 1 L y, a continuación, se procedió a esterilizar dicho material en autoclave, durante 15 min, a 121 °C (tres esterilizaciones, según principio de la tindalización). Posteriormente, se adicionó 1 ml del reconstituido del liofilizado de la cepa de

Pseudomonas aeruginosa PSS a la tierra de jardín estéril, para establecer una concentración inicial de 1.3×10^{10} UFC/g de tierra. El preparado en tierra de jardín se almacenó a temperatura ambiente, hasta su empleo, a los diferentes tiempos en estudio, para definir su estabilidad.

Preparación de los frascos e inoculación en agua destilada estéril

Se emplearon frascos de vidrio (con boca de rosca y tapa de baquelita), que contenían 9 ml de agua destilada. Los frascos se esterilizaron a 15 libras, durante 20 min. Seguidamente, se adicionó el volumen apropiado del liofilizado reconstituido del microorganismo a cada frasco (que contenían agua destilada estéril), para establecer una concentración inicial de 1.3×10^{10} UFC/ml. Los frascos se almacenaron en refrigeración (aproximadamente 4 °C), hasta su empleo a los diferentes tiempos en estudio, para definir la estabilidad del preparado.

Comprobación de la viabilidad

La viabilidad se evaluó a los tiempos: seis meses y 20 años, mediante siembra a profundidad de los microorganismos conservados (en tierra de jardín o en agua destilada estéril), en placas de Petri, previamente preparadas con medio de cultivo Agar nutriente o King B. Se procedió a incubar la siembra realizada a 30 °C, durante 24 h; y, posteriormente, se realizaron los conteos para determinar la concentración (en UFC/ml) de los microorganismos conservados en el estudio.

Adicionalmente, con los valores obtenidos de las UFC/ml se procedió a realizar la comparación entre los dos métodos de conservación, a los tiempos en estudio correspondientes a 6 meses y 20 años, con el empleo del estadígrafo t de Student, del programa estadístico STATGRAPHIC. Se estableció, además, la determinación de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ) a los diferentes tiempos de conservación y se procedió a comparar los valores de esta variable con el valor obtenido para esta, al tiempo inicial del estudio.

Con los tiempos de conservación, correspondientes a los previamente mencionados (inicial, 6 meses y 20 años), así como con otros incluidos en este estudio (3 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años y 10 años), se procedió a estimar la relación entre la concentración de células viables del microorganismo UFC/g (o UFC/ml) y el tiempo en estudio, con el empleo de la opción de análisis de regresión del programa estadístico STATGRAPHIC, para los dos medios de conservación.

Tinción de Gram para la identificación del microorganismo y determinación cualitativa del sideróforo (Pioverdin-II)

La tinción de Gram se realizó según el procedimiento descrito por otros autores, para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se tomó como base la morfología típica de este microorganismo, luego de dicha tinción. La determinación cualitativa del compuesto Pioverdin-II (sideróforo) se estableció acorde a la observación visual del color verde, que es característico para este pigmento y permitió, además, (de conjunto con la tinción de Gram) la identificación del microorganismo (1, 2, 5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mayor número de las células observadas al microscopio (más del 95 % de las células por campo) se correspondieron con la morfología típica de *Pseudomonas aeruginosa* (figura. 1), lo que avala la pureza del cultivo, para los diferentes tiempos en estudio. Así, se observaron bacilos Gram-negativos pequeños, motiles y rectos (algunos ligeramente curvos). tanto en el tiempo inicial como en los tiempos previamente descritos (6 meses y 20 años).

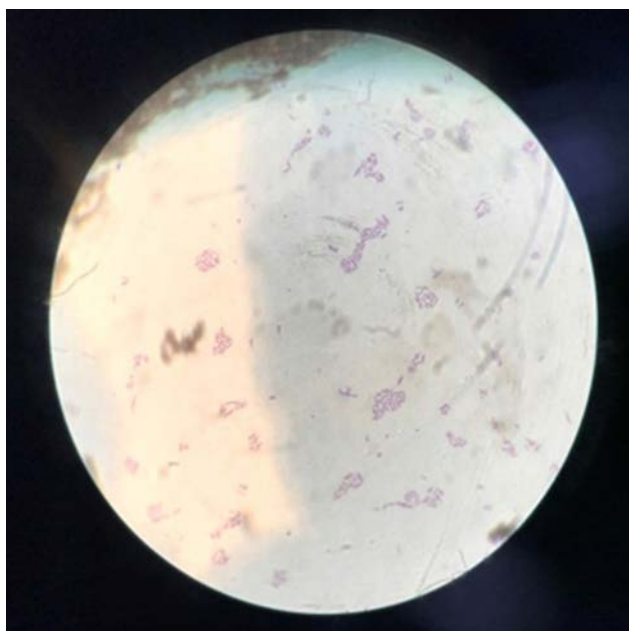


Figura 1. Imagen correspondiente a la tinción de Gram del cultivo de células de *Pseudomonas aeruginosa* PSS, procedente del tiempo inicial, con el empleo de agua destilada estéril como método de conservación. Se empleó microscopía óptica con una magnificación de 100X.

La cepa en estudio, en el medio de cultivo de Agar Nutriente, mostró colonias planas blanco-grisáceas, con bordes irregulares. En el medio King B, el microorganismo produjo un pigmento amarillo-verdoso fluorescente (figura. 2), al tiempo inicial, a los 6 meses y a los 20 años. Dicho pigmento es el sideróforo Pioverdin II, cuya aparición se ha reportado por otros autores, al realizar cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* (5, 9); los que, además, describen la síntesis por el microorganismo de otros metabolitos antimicrobianos del tipo mono-acetil-fluoroglucinol.

Se obtuvo, por ambos métodos de conservación, una alta recuperación de las células, al compararse con reportes previos de conservación de bacterias (6, 7). Para ambos métodos de conservación se determinaron concentraciones de células en el orden de 10^8 y 10^{10} UFC/g (o UFC/ml), a los 8 meses y de 10^6 y 10^8 UFC/g (o UFC/ml) a los 20 años, para las estrategias de conservación en tierra de jardín estéril y agua destilada estéril, respectivamente.



Figura 2. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PSS, luego del cultivo en superficie del microorganismo, procedente de tierra de jardín estéril en medio King B. Se visualiza, además, la producción de sideróforo.

Los títulos antes referidos para los dos métodos de estabilidad en estudio; así como la presencia, en cada uno de ellos, del sideróforo (visualizado en cada caso por coloración verde de las colonias del microorganismo en el medio King B) permiten establecer, durante al menos 20 años, la producción del GLUTICID® (importante fungicida biológico para la agricultura y otros usos). Sin embargo, debe señalarse que, a pesar de que ambos métodos garantizan niveles de viabilidad adecuados, el método de conservación en agua destilada estéril fue marcadamente superior $p < 0.05$ (tabla 1).

La tabla 1 muestra los resultados de la viabilidad expresada en UFC/g (o UFC/ml) de la cepa conservada en tierra de jardín estéril y en agua destilada estéril al tiempo inicial, a los 6 meses y a los 20 años.

Tabla 1. Viabilidad de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS, en tierra de jardín estéril y agua destilada estéril

Modo de conservación	UFC/g (UFC/ml) ^a (t = 0 meses)	UFC/g (UFC/ml) ^a (t = 6 meses)	UFC/g (UFC/ml) ^a (t = 20 años)
Tierra de jardín estéril	1.30×10^{10}	9.6×10^8	1.9×10^6
Agua destilada estéril (valor de p) ^b	1.30×10^{10} (ND)	1.14×10^9 (p = 0.0026)	1.0×10^8 (p = 0.0014)

a: La concentración de células para el método de conservación en agua destilada estéril se expresa en UFC/ml

b: Valor de probabilidad calculado con el empleo del estadígrafo t de student al comparar los valores de concentración obtenidos por ambos métodos

ND: No definido, pues al tiempo inicial (t=0), ambos métodos de conservación tienen el mismo valor de concentración celular inicial

Teniendo en cuenta los resultados antes referidos y los reportados por otros autores (2, 10) se evidencia que la implementación del método de preservación estará en dependencia del microorganismo en cuestión (importancia y requerimientos fisiológicos), así como del depositario (recursos disponibles y alcance). Así, la recuperación obtenida por ambos métodos de conservación (diferencia entre el valor inicial de concentración y el valor para el tiempo en estudio) fue inferior a 4 unidades en escala logarítmica de los datos (tabla 1), lo que garantiza que para los tiempos evaluados, el material biológico conservado cumplirá con los requerimientos definidos como óptimos (1) y que permiten:

- Razonable tasa de sobrevivencia y recuperación celular,
- Integridad genotípica y fenotípica que garanticen resultados reproducibles y buenas prácticas de seguridad biológica,
- Se evita el estado pospreservación “viable pero no cultivable”,
- Ausencia de contaminaciones del cultivo puro.

En la tabla 2 se pueden observar los valores de concentración (expresados en UFC/g) para los diferentes tiempos de conservación estudiados, con el empleo del método de conservación de tierra de jardín. No se obtuvieron diferencias significativas para los valores de velocidad de crecimiento específico (μ), para todos los tiempos en estudio.

Lo antes expresado avala el uso de este microorganismo como iniciador (o starter) en procesos fermentativos en los que se emplee, luego de transcurridos intervalos de tiempo que oscilen entre 3 meses y 20 años, para el método de conservación empleado. Un resultado similar se aprecia en

cuanto a la no diferencia de los valores de μ obtenidos, para el método de conservación que utiliza el agua destilada estéril (tabla 3). Debe señalarse que este segundo método de conservación, presentó mayores valores de concentración de células, para los diferentes tiempos en estudio, lo cual lo define como el método de conservación más efectivo de los empleados.

Tabla 2. Relación entre el tiempo de conservación y la viabilidad del microorganismo con el empleo de tierra estéril de jardín

Tiempo de conservación	Años	UFC/g	μ (h ⁻¹)	Diferencia con μ (versus t = 0)
0 meses	0	1.3*10 ¹⁰	0.27	0.658 ^{NS}
3 meses	0.25	1.1*10 ⁹	0.24	0.606 ^{NS}
6 meses	0.5	9.6*10 ⁸	0.28	0.351 ^{NS}
9 meses	0.75	9.1*10 ⁸	0.31	0.612 ^{NS}
1 año	1	8.2*10 ⁹	0.29	0.698 ^{NS}
2 años	2	5.5*10 ⁸	0.34	0.259 ^{NS}
3 años	3	3.6*10 ⁸	0.27	0.617 ^{NS}
5 años	5	1.7*10 ⁸	0.29	0.247 ^{NS}
10 años	10	2.8*10 ⁷	0.31	0.279 ^{NS}
20 años	20	1.9*10 ⁶	0.31	0.666 ^{NS}

NS: Diferencia no significativa ($p > 0.05$)

Para ambos métodos en estudio se logró definir una relación entre la concentración de células obtenidas y el tiempo en estudio, como muestra la figura 3. Para el método de conservación en tierra de jardín, se obtuvo una relación de potencia entre el logaritmo de las UFC/ml y el tiempo en estudio que ajustó, de manera óptima, las variables analizadas ($R^2 = 0.943$), como se aprecia en la figura 3 A. Con relación al método de conservación que emplea agua destilada estéril, también se obtuvo una relación de óptimo ajuste entre las variables analizadas ($R^2 = 0.979$), como se puede observar en la figura 3 B. Ambos resultados permiten definir como adecuados a ambos métodos de conservación para predecir el valor de concentración celular que se obtendría, a diferentes tiempos de conservación.

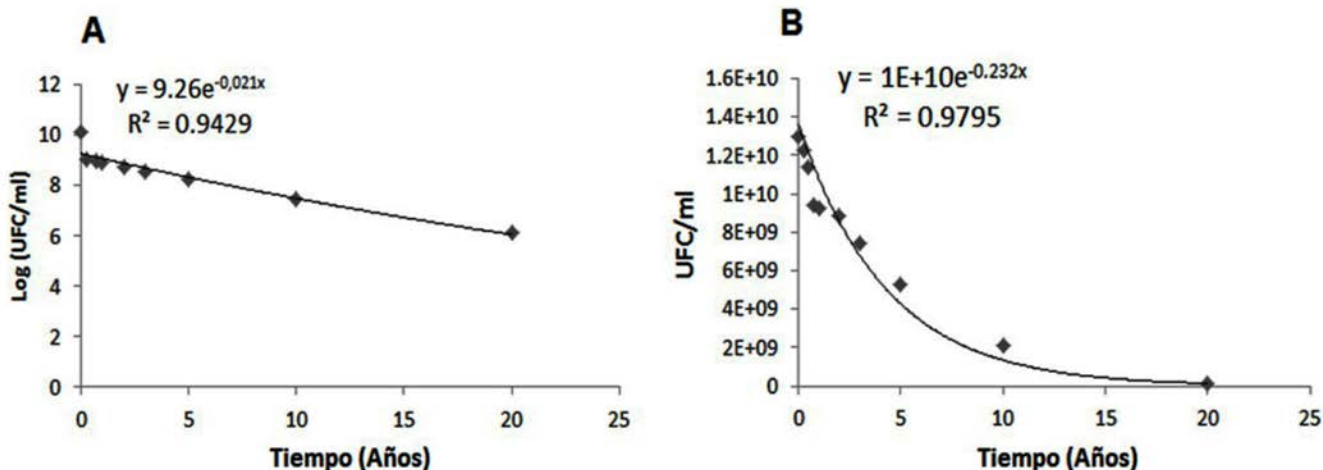
Con los métodos de conservación empleados en este estudio (que se distinguen sobremanera por el hecho de ser sencillos y económicos) se incentiva la búsqueda y el mejoramiento de métodos de conservación de cepas microbianas destinadas a la preservación de pequeñas colecciones en instituciones de no altos recursos que atesoren material biológico, sin desestimar por ello el perfeccionamiento de métodos más innovadores que puedan brindar un servicio de un alto grado de especialización.

Tabla 3. Relación entre el tiempo de conservación y la viabilidad del microorganismo con el empleo de agua destilada estéril

Tiempo de conservación	Años	UFC/ml	μ (h ⁻¹)	Diferencia con μ (versus t = 0)
0 meses	0	1.3*10 ¹⁰	0.28	0.609 ^{NS}
3 meses	0,25	1.23*10 ¹⁰	0.33	0.227 ^{NS}
6 meses	0,5	1.14*10 ¹⁰	0.28	0.635 ^{NS}
9 meses	0,75	9.41*10 ⁹	0.27	0.374 ^{NS}
1 año	1	9.22*10 ⁹	0.29	0.413 ^{NS}
2 años	2	8.87*10 ⁹	0.32	0.257 ^{NS}
3 años	3	7.4*10 ⁹	0.31	0.341 ^{NS}
5 años	5	5.3*10 ⁹	0.26	0.367 ^{NS}
10 años	10	2.1*10 ⁹	0.27	0.407 ^{NS}
20 años	20	1*10 ⁸	0.29	0.423 ^{NS}

NS: Diferencia no significativa ($p > 0.05$).

Sin duda, la implementación de toda estrategia de conservación (como las discutidas en este trabajo o de métodos más costosos y novedosos) deberá evidenciar una tendencia marcada hacia la reducción de tamaños del soporte de conservación, de tiempos de consumo de energía y del riesgo biológico durante la manipulación (4, 10).

**Figura 3.** Relación entre la concentración de células y el tiempo de conservación para los dos métodos de conservación empleados.

En la figura 3A se muestra la relación logarítmica entre la concentración de células y el tiempo de estudio en años, para el método de conservación de tierra de jardín. En la 3B se muestra la relación exponencial entre la concentración de células y el tiempo en estudio, para el método de conservación en agua destilada estéril. Para ambos gráficos se muestran, además, la ecuación y el coeficiente de correlación (R^2).

CONCLUSIONES

1. Los métodos de conservación en tierra de jardín y agua destilada fueron efectivos para la conservación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PSS, durante 20 años, pues:
 - Se obtienen valores de concentración de células viables para dicho tiempo de conservación, permiten el uso de microorganismo como iniciador (o starter) de procesos fermentativos (similar μ para los tiempos estudiados).
 - Se evidencia la pureza del cultivo a través de la tinción de Gram.
 - Se mantiene la capacidad del microorganismo de producir el sideróforo (metabolito que correlaciona con la capacidad de fomentar el crecimiento vegetal).
2. El método de conservación en agua destilada estéril mostró resultados superiores, en cuanto a capacidad de conservación, en comparación con el método de conservación que emplea tierra estéril de jardín.
3. Las relaciones establecidas para ambos métodos de conservación, entre la concentración de células y el tiempo; que ajustan, de manera óptima, dicha relación entre las dos variables ($R^2 > 0.94$ en ambos casos) permite estimar el número de células viables en función del tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, A.K. 2019. Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia. Tesis para optar por el grado de máster (Universidad de Santander. Bucaramanga, Colombia).
2. Bueno, L.; Almeida, G. 2000 "Evaluación morfológica y fisiológica de cultivos de género *Botryodiplodia theobromae* conservados en agua destilada". *Laborat Acta*. 12 (1): 21-24.
3. Sarmiento, Y.; Hazel, V.; Cárdenas, D. 2013. Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos. *Rev. Colomb. Biotecnol.*1: 22-26.
4. King, E. O.; Ward, M.; Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein production. *J. Lab. Clin. Med.* 44():301-307.
5. Kang, D.; et al. 2018. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. 19(1):804-817.
6. León M.; Gallardo, R. 2005. "Efectividad de la tierra de jardín y la liofilización en la preservación de cultivos fúngicos. ICIDCA". Memorias del V Taller Nacional de Colecciones de Cultivo y otros Materiales Biológicos, en soporte electrónico.
7. Mateos, P.F. 2002. Mantenimiento y conservación de microorganismos industriales. Manual de microbiología.
8. Arísticas, R.C.; et al. 2022. Constitutive High Expression Level of a Synthetic Deleted Encoding Gene of *Talaromyces minioluteus* Endodextranase Variant (r-TmDEX49A- Δ SP- Δ N30) in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Appl. Sci.* 12(15): 7562-7.
9. Fandiño, C.; et al. 2021. Empleo de nutrisales en el proceso de fermentación alcohólica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 55(2):28-31.
10. García, M.D.; Uruburo, F. 2020. Conservación de cepas microbianas. *Actualidad. SEM@FORO*. 23:32-35.