

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XXV - Núm. 4

1984

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Secretario de Redacción:

Prof. Dr. D. José Jiménez
Martín

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia.
Granada - España.

Dep. Legal. GR: núm. 17-1960

ISSN 0004 - 2927

Imprime:

Gráficas del Sur, S. A
Boquerón, 6
Granada 1984

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Conservación de cepas bacterianas por congelación sobre discos de celulosa, por A. Ceña, G. Alvarez de Cienfuegos y A. Ramos-Cormenzana 389
- Anti-inflamatorios: Actividad comparativa salsalato-indometacina, por Cabo, J.; Cabo, María M.; García, S.; González, A.; Miró, M. 399
- Anti-inflamatorios: Estudio comparativo de algunos agentes flogógenos, por Cabo, J.; Cabo, María M.; García, S.; González, A.; Miró, M. 403
- Método de cultivo de *Hyalomma (Hyalomma) marginatum marginatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae), por L. E. Hueli; D. C. Guevara Benítez y P. García Fernández 407
- Determinación de NO_3^- con electrodo de ión selectivo en agua de bebida de diversas poblaciones de la provincia de Granada, por Muros Guadix, P.; Olea Serrano, María R. F. y García-Villanova, R. 415
- Caracteres bioclimáticos, edafológicos, geológicos y botánicos de la Sierra de la Sagra. (Nota I), por A. M. Negrillo Galindo y G. Marín Calderón 421

TRABAJOS DE COLABORACION

- Estudio epidemiológico de la litiasis en Armilla (Granada), por A. Pedrajas, T. Rodríguez, J. Aguilar, M. Arrabal y J. L. Mijan... .. 435
- Crítica de Libros 443

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS POR CONGELACION SOBRE DISCOS DE CELULOSA

A. Ceña, G. Alvarez de Cienfuegos y A. Ramos-Cormenzana

RESUMEN

Se estudia la conservación de cepas bacterianas pertenecientes a diferentes géneros y especies, por congelación a 30°C utilizando como soporte discos de papel de celulosa. Asimismo se compruebe si esta técnica puede ser utilizada para la conservación de bacterias estructural y fisiológicamente diferentes entre sí o si por el contrario no es aconsejable para determinados tipos bacterianos.

Los resultados obtenidos, muestran que la congelación de suspensiones bacterianas sobre discos de celulosa, mantiene la viabilidad en condiciones suficientemente satisfactorias para considerar que esta técnica es un procedimiento eficaz de conservación de cepas bacterianas. Debe resaltarse el hecho de que la recuperación de las cepas no halófilas, tanto de Colección como de muestras clínicas, no requiere, en la mayoría de los casos de medios de enriquecimiento.

SUMMARY

The conservation of bacterial strains adscribed to different genus and species, by freezing at -30°C using disc paper of cellulose have been studied. It has also tested wether this technique can be utilized for maintenance of microorganisms with structural and physiologic differences.

The results show how the freezing of bacterial cultures on cellulose disc paper, keep the bacterial viability in good conditions. This technique is a good way of mainteneance of bacterial strains. It is significative that for recuperation of non halophiles strains, no enrichment medium is required.

INTRODUCCION

Una de las técnicas más comunmente utilizadas en un laboratorio de Investigación, es conservar el material biológico con el que se trabaja. Según el tipo de tra-

bajo que se realice, la conservación se hará para un periodo corto de tiempo o para un periodo indefinido, en el primer caso estamos ante lo que se denomina "mantenimiento" y solo en el segundo caso podemos hablar verdaderamente de "conservación".

La gran variedad de técnicas y métodos utilizados para el mantenimiento y conservación de microorganismos viene condicionado en gran parte por el periodo de tiempo previsto para su conservación y por las distintas propiedades biológicas de los microorganismos.

Los tres fines básicos de la conservación de un cultivo bacteriano son: mantenerlo viable, no contaminado y con sus características biológicas inalteradas. Ningún método garantiza de forma absoluta la completa estabilidad de las propiedades iniciales de los cultivos (1) por eso es conveniente seleccionar en cada caso el método más adecuado.

Las técnicas más ampliamente utilizadas en la conservación de las cepas bacterianas se basan en la reducción de la actividad metabólica mediante la aplicación de bajas temperaturas (2).

En el presente trabajo, hemos estudiado la conservación de diferentes cepas bacterianas, pertenecientes a distintos géneros especies, por congelación a -30°C , utilizando como soporte discos de papel de celulosa. Asimismo hemos comprobado si la técnica seguida por nosotros puede ser utilizada para la conservación de bacterias estructural y fisiológicamente diferentes entre sí, o si por el contrario no es aconsejable para un determinado tipo bacteriano.

MATERIAL Y METODOS

Utilizamos 175 cepas bacterianas, de las cuales 20 pertenecen a la Colección de nuestro Departamento, 100 proceden de muestras de nasofaringe humanas y 55 son bacterias halofilas moderadas aisladas en las salinas de Santa Pola (Alicante) (Tabla I).

Las bacterias se siembran en los correspondientes medios líquidos para obtener un buen crecimiento, CT para las cepas del género *Myxococcus* (3), MHL para las bacterias moderadas (4) y el medio TSB para las demás cepas ensayadas. Posteriormente, en un vial estéril que contiene discos de papel de celulosa Watman del número 4 de 0,5 cm de diametro, añadimos 4 ml del cultivo bacteriano, se agita vigorosamente durante 15 minutos para conseguir una buena impregnación de los discos. El cultivo sobrenadante se elimina con ayuda de una pipeta Pasteur. Los viales se introducen en un congelador a -30°C .

Comprobación de la viabilidad de las cepas conservadas: Para estudiar la viabilidad de las cepas se hacen comprobaciones al cabo de 3 y 6 meses de haberlas sometido a congelación. Transcurrido el tiempo correspondiente, los discos congelados se colocan en placas que contienen el medio adecuado para el desarrollo de la bacteria en cuestión (CTA para las cepas del género *Myxococcus*, MHS para las

TABLA I. Microorganismos utilizados y medios de crecimiento.

Microorganismos	Medios
CEPAS DE COLECCION	
<i>Micrococcus luteus</i>	TSB/TSA
<i>Micrococcus lysae</i>	TSB/TSA
<i>Micrococcus varians</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus sciuri</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus simulans</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus spidermidia</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus intermedius</i>	TSB/TSA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	TSB/TSA
<i>Bacillus megaterium</i>	TSB/TSA
<i>Bacillus brevis</i>	TSB/TSA
<i>Bacillus macerans</i>	TSB/TSA
<i>Bacillus firmus</i>	TSB/TSA
<i>Citrobacter freundii</i>	TSB/TSA
<i>Salmonella enteritidis</i>	TSB/TSA
<i>Serratia marcescens</i>	TSB/TSA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	TSB/TSA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB/TSA
<i>Myxococcus xanthus</i> MD-2	CT/CTA
<i>Myxococcus xanthus</i> MD-4	CT/CTA

MUESTRAS CLINICAS

Nº de cepas		
8	<i>Bacillus</i> spp.	TSB/TSA
12	<i>Corynebacterium</i> spp.	TSB/TSA
64	<i>Staphylococcus</i> spp.	TSB/TSA
10	<i>Micrococcus</i> spp.	TSB/TSA
4	<i>Streptococcus</i> spp.	TSB/TSA

BACTERIAS HALOFILAS

1	<i>Micrococcus</i> sp.	MHL/MHS
27	<i>Planococcus</i> spp.	MHL/MHS
2	<i>Acinetobacter</i> spp.	MHL/MHS
5	<i>Alcaligenes</i> spp.	MHL/MHS
4	<i>Chromobacterium</i> spp.	MHL/MHS
2	<i>Alteromonas</i> spp.	MHL/MHS
11	<i>Flavobacterium</i> spp.	MHL/MHS
5	<i>Vibrio</i>	MHL/MHS

cepas holofilas moderadas y TSA para las restantes bacterias), se incuban a 37°C durante un máximo de 14 días. De no existir crecimiento se introducen los discos en el medio líquido adecuado. Se da como negativa la recuperación si pasados 7 días no se aprecia crecimiento.

Comprobación de la reducción de la viabilidad: Hemos analizado la eficacia de este procedimiento de conservación de bacterias, mediante la comprobación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de la conservación. Para esta comprobación se han escogido 18 cepas pertenecientes a la Colección de nuestro Departamento, siguiendo la técnica de la gota para el recuento de las UFC descrita por MILES y MISRA (5).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio de la viabilidad de las diferentes cepas bacterianas ensayadas, conservadas en discos de celulosa por congelación a -30°C vienen indicados en la Tabla II. En ella se puede observar que el mantenimiento de la viabilidad es satisfactorio en el caso de las cepas pertenecientes a la Colección de nuestro Departamento y las procedentes de muestras clínicas humanas. La viabilidad de las bacterias halófilas moderadas es menor.

TABLA II

Porcentaje de viabilidad bacteriana de las cepas conservadas a - 30°C en soporte de papel de celulosa.

Bacterias	3 meses	6 meses
Cepas de Colección	100	95
Muestras Clínicas	100	100
Halofilas Moderadas	82	64

En las figuras 1, 2, 3 y 4, representamos gráficamente la evolución de las UFC a lo largo del periodo de conservación en las 18 cepas de la colección de nuestro Departamento. Se ha elegido la representación en escala semilogarítmica que refleja con mayor claridad la evolución de los resultados.

En la Tabla III, se exponen los valores medios de las tasas de mortalidad correspondientes a cada uno de los intervalos de tiempo estudiado. La utilidad de estos datos estriba en que al no ser acumulativos, nos permiten estudiar la cinética

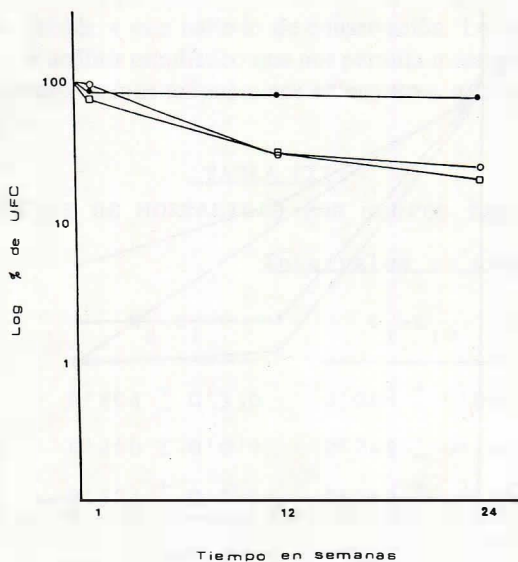


Figura 1.- Evolución de la viabilidad con respecto al tiempo de *Micrococcus luteus* (*), *Micrococcus lysae* (□) y *Micrococcus varians* (○).

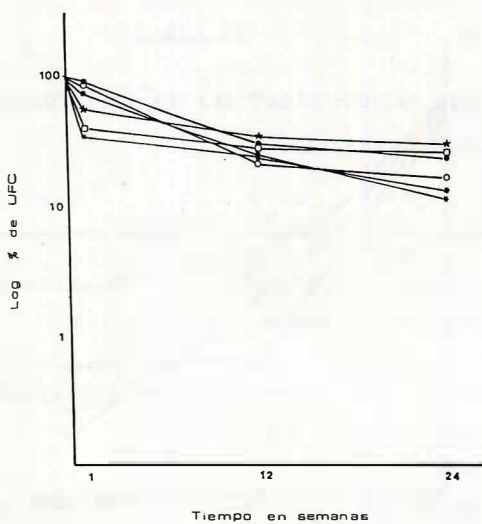


Figura 2.- Evolución de la viabilidad con respecto al tiempo de *Staphylococcus sciuri* (*), *Staphylococcus simulans* (*), *Staphylococcus aureus* (*), *Staphylococcus epidermidis* (○), *Staphylococcus intermedius* (*) y *Staphylococcus saprophyticus* (○).

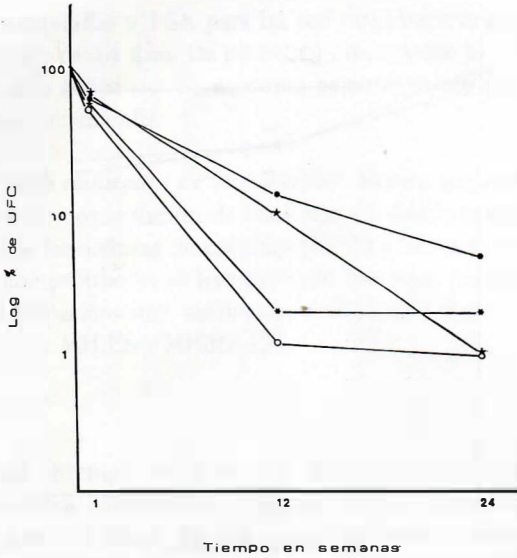


Figura 3.- Evolución de la viabilidad con respecto al tiempo de *Bacillus megaterium* (●), *Bacillus brevis* (✱), *Bacillus marcerans* (◐) y *Bacillus firmus* (○).

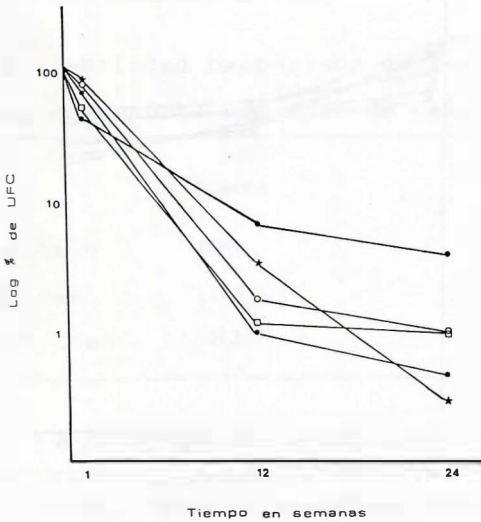


Figura 4.- Evolución de la viabilidad con respecto al tiempo de *Citrobacter freundii* (◐), *Salmonella enteritidis* (✱), *Serratia marcescens* (◑), *Acinetobacter calcoaceticus* (◑) y *Pseudomonas fluorescens* (○).

de la mortalidad debida a este método de conservación. Los resultados son idoneos para aplicar el análisis estadístico que nos permita investigar las posibles diferencias entre distintos grupos taxonómicos en cuanto a su capacidad de supervivencia.

TABLA III

TASAS MEDIAS DE MORTALIDAD POR GRUPOS TAXONOMICOS.

Intervalos en semanas

Grupo Taxonómico	t_{0-t_1}	$t_{1-t_{12}}$	$t_{12-t_{24}}$
Cocos G +	0'404 \pm 0'356	0'068 \pm 0'040	0'024 \pm 0
Bacilos G +	0'460 \pm 0'079	0'245 \pm 0'103	0'071 \pm 0
Bacilos G -	0'524 \pm 0'284	0'340 \pm 0'119	0'110 \pm 0

Finalmente en la Tabla IV, se recojen los resultados tras aplicar el análisis estadístico de las tasas medias de mortalidad al comparar estos valores entre los tres grupos estudiados y ver cuales de ellos se ven más afectados por la metodología aplicada.

TABLA IV

ANALISIS ESTADISTICO^a DE LAS TASAS MEDIAS DE MORTALIDAD.

Intervalos en semanas

Comparaciones	t_{0-t_1}	$t_{1-t_{12}}$	$t_{12-t_{24}}$
Cocos G + <u>v.s</u> Bacilos G +	0'323 N.S.	10'411 0'0005	1'604 N.S.
Cocos G + <u>v.s</u> Bacilos G -	0'917 N.S.	9'060 0'0005	2'065 0'050
Bacilos G + <u>v.s</u> Bacilos G -	0'474 N.S.	2'638 0'025	0'525 N.S.

a.- Mediante la t de Student.

N.S.- No significativo.

DISCUSION

Los resultados expuestos anteriormente muestra que la congelación de suspensiones bacterianas sobre discos de celulosa mantiene la viabilidad bacteriana en condiciones suficientemente satisfactorias como para considerar que esta técnica es un procedimiento eficaz de conservación de cepas bacterianas.

Nuestras experiencias cualitativas ponen de manifiesto que la recuperación de bacterias viables, en número y condiciones suficientes como para iniciar subcultivos en medios adecuados, es posible para la casi totalidad de las cepas ensayadas, con la notable excepción del grupo de bacterias halófilas moderadas.

Destacamos asimismo que este método se muestra efectivo incluso en la conservación de las cepas pertenecientes al género *Myxococcus*, cuyo mantenimiento no es fácil y que generalmente requiere engorrosas resiembras periódicas cada 4 días.

En cuanto a las 100 cepas de origen clínico incluídas en nuestro estudio, la homogeneidad de los datos se correlaciona sin duda con su propia homoneidad taxonómica, ya que 80 de ellas son cocos Gram +, pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*. Estimamos que esto supone una base experimental suficiente como para afirmar que este método de congelación sobre papel de celulosa es eficaz en la conservación de cepas de cocos Gram + aerobios o facultativos, y por extensión, resulta útil para conservar cepas de origen clínico aisladas de infecciones nasofaríngeas.

Las cepas halófilas moderadas plantearon mayores dificultades en su recuperación. A nivel puramente teórico, podemos apuntar la posibilidad de que influya la especial composición citoplasmática, consecuencia de la adaptación a medios con elevada concentración salina y que se refleja fundamentalmente en la presencia de altas molaridades de determinados componentes citoplasmáticos que actúan como solutos compatibles (6). Cabe la posibilidad de que el comportamiento del citoplasma a temperaturas muy inferiores a la de congelación del agua, se vea muy influenciado por la presencia de estos solutos compatibles. Por otra parte, cabría considerar que la propia composición del medio de cultivo en que se congelan las bacterias, con su alta osmolaridad salina, juegue algún papel en la disminución de la viabilidad de las cepas congeladas.

Los resultados obtenidos en el estudio de la reducción de la viabilidad muestran que existe una pérdida de la viabilidad cuantitativamente importante en casi todas las cepas ensayadas. Las menores reducciones las presentaron algunos de los cocos Gram + ensayados. No obstante, nuestros datos no nos permiten generalizar, ya que si bien las tasas de mortalidad calculadas después de una semana de conservación, dan valores medios de 0,404 para los cocos Gram +, 0,460 para los bacilos Gram -, estas diferencias sometidas al análisis estadístico no resultan significativas a un nivel de confianza del 95 por ciento. Cuando se realizan las medidas a los tres meses de congelación, los porcentajes de reducción se acentúan en todas las mues-

tras. Si aplicamos el análisis estadístico, advertimos que los cocos Gram + sufren al cabo de este tiempo reducciones significativamente menores que cualquiera de los otros dos grupos bacterianos estudiados. Ello se debe a que las tasas de mortalidad entre la primera medida y la segunda dan unas medias de 0,068 para los cocos Gram + , 0,245 para los bacilos Gram + y 0,340 para los bacilos Gram-; siendo significativas las diferencias entre cocos Gram + y bacilos Gram + (nivel de confianza superior al 99,9 por ciento) y entre cocos Gram + y bacilos Gram- (nivel de confianza similar al anterior) (Tabla IV), no siendo así entre ambos grupos de bacilos.

Estas diferencias se conservan en los porcentajes de reducción encontrados 6 meses después de la congelación; no obstante, examinando las tasas de mortalidad correspondientes, encontramos que no existen diferencias significativas entre bacilos Gram + y cocos Gram + , ni entre bacilo Gram + y Gram-, sí las hay entre cocos Gram + y bacilos Gram- ya que estos últimos presentan también en este intervalo una mortalidad alta (Tabla IV).

En líneas generales podemos afirmar que nuestros resultados concuerdan con el hecho bien conocido de que las formas cocáceas son más resistentes a los agentes físicos que las bacilares (7).

Finalizamos señalando que, a nuestro juicio, el método de conservación de bacterias por congelación sobre discos de celulosa se ha mostrado adecuado para el mantenimiento de cepas de diverso origen y situación taxonómica presentando además las ventajas de no requerir técnicas ni medios especialmente costosos o sofisticados.

BIBLIOGRAFIA

1. TROITSKAYA, E.N. 1979. Prikl. Biokim. Microbiol., 15: 402-408.
2. HILL, L.R. 1981. En J. Norris y D.W. Ribbones (ed). Assays Applied Microbiology. Vol. 2, pp 2-31. Chischester.
3. DWORKIN, M. 1962. J. Bacteriol., 84: 250-257.
4. VENTOSA, A. 1981. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
5. MILES, A.A. y MISRA, S.S. 1938. J. Hyg. Cam. 38: 732-736.
6. KUSHNER, D.J. 1978. En Microbiol life in extreme environments. Academic Press, pp. 318-368. Londres.
7. MOAT, A.G. 1979. En Microbial Physiology. Wiley and Sons. pp. 444-545. Nueva York.