

Estudio microcalorimétrico del crecimiento de dos especies de micoplasmas

B.V. RODRÍGUEZ,¹ R. CONTRERAS² Y E. ALMORA¹

¹ Departamento de Cultivo de Tejido Animal, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, La Habana, Cuba

² Departamento de Microbiología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, La Habana, Cuba

Recibido en noviembre de 1988

Aprobado en enero de 1989

RESUMEN

Se utilizó el método microcalorimétrico para estudiar el comportamiento de dos cepas de micoplasmas, responsables de la infección de cultivo de células animales. Los termogramas obtenidos permitieron realizar un análisis comparativo de diferentes parámetros entre estas especies, lo cual indica la aplicación ventajosa de este método sobre los métodos convencionales de detección del crecimiento para estos microorganismos.

SUMMARY

The microcalorimetric method was used to study the behaviour of two mycoplasma strains which are able to infect animal cell cultures. A comparative study was performed using the thermograms obtained for each strain, showing, in fact, the advantages of this method in comparison with the conventional detection tests for these microorganisms.

INTRODUCCION

Todos los procesos biológicos están acompañados por un desprendimiento de calor; pueden ser detectados cuantitativamente por calorimetría (Liungholm y Wadso, 1976; Wadso, 1974).

La microcalorimetría tiene un amplio espectro de aplicación, puede ser utilizada para detectar crecimiento, e identificar y enumerar poblaciones microbianas (Boling *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1986; Monk y Wadso, 1975).

Los micoplasmas son organismos procarióticos, responsables en la mayoría de los casos de la infección en los cultivos de células animales, por lo que resulta de gran importancia el conocimiento de las principales características y consecuencias que tal infección puede provocar en las investigaciones biológicas que dependen de células cultivadas (McGarrity *et al.*, 1984; Schmidt y Erfle, 1984).

Generalmente, el crecimiento de los micoplasmas se mide por conteo en placas (UFC/ml), turbidimetría, etc., pero se hace muy difícil por estos métodos conocer el momento en que el microorganismo alcanza su velocidad máxima de crecimiento. Con esta finalidad fue que aplicamos el método microcalorimétrico a dos especies del género

Micoplasma (*M. arginini* y *M. hyorhinis*) responsables, entre otras, de la infección en los cultivos celulares, con el objetivo de estudiar el comportamiento de las mismas durante su crecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se estudiaron las especies de *Micoplasma arginini* (proveniente de un kit diagnóstico de la Flow) y *Micoplasma hyorhinis* (cepa GDL, aislada de una muestra suministrada por el doctor Gerard Mc Garrity, del Corriell Institute for Medical Research).

Condiciones de crecimiento

En el mantenimiento de las cepas se utilizó un medio básico (Stanbridge y Schneider, 1977) compuesto por caldo PPLO (DIFCO) suplementado con suero de caballo al 20 % y extracto de levadura, arginina y glucosa al 0,5 % a un pH final de 7,2-7,4, en el cual crecieron durante 48 horas a 37°C.

Posteriormente se realizó el conteo de colonias en placas, en medio agar PPLO (DIFCO) con los mismos suplementos que el medio líquido, con este fin se aplicó el método de Miles y Misra (1938), para determinar la concentración exacta de cada cultivo en términos de UFC/ml.

A partir de los resultados del conteo para cada cultivo (*M. Arginini*: 2×10^7 UFC/ml y *M. hyorhinis*: $1,5 \times 10^7$ UFC/ml), se realizaron las diluciones correspondientes para ser registradas por el calorímetro, trabajándose en ambos casos con 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/ml.

Microcalorimetría

El crecimiento fue monitoreado utilizando un calorímetro de conducción multicanal para monitoreo de bioactividad producido por la LKB, modelo 2277, según lo descrito (Miles *et al.*, 1985).

La temperatura del calorímetro fue mantenida a 37°C y se trabajó con una potencia de 0-100 μ W, realizándose tres repeticiones de la experiencia para cada especie de micoplasma. Se utilizaron ampulas de cristal estériles a las cuales se les añadió 2 ml de cada una de las diluciones de los cultivos realizados.

Como blanco se utilizaron para cada cultivo ampulas con 2 ml de caldo PPLO estéril.

Al mismo tiempo se utilizaron los valores de las réplicas de la especie de *M. arginini*, medidas en el calorímetro, para analizar estadísticamente si hubo alguna diferencia significativa entre los resultados, estableciéndose el coeficiente de variación para cada parámetro obtenido, lo cual puede extenderse a otras especies de este género, entre ellas *M. hyorhinis*.

RESULTADOS Y DISCUSION

La curva de potencia-tiempo (termograma) obtenida para las especies de *M. arginini* y *M. hyorhinis*, muestra una forma similar consistente en un pico de poca energía con una rama ascendente suave y una rama descendente más aguda, evidenciando el agotamiento rápido de un sustrato o el acúmulo de un catabolito inhibitor (figuras 1 y 2).

Cuando se eleva la concentración de células del inóculo (en términos de UFC/ml) para ambas cepas se obtiene una disminución del tiempo de latencia y de la altura máxima, y un incremento de la relación altura máxima/tiempo.

En la tabla 1 se representan los valores obtenidos a partir de las réplicas para cada especie, donde se muestra el análisis comparativo de estas, observándose un mayor tiempo de latencia para *M. hyorhinis*, un ligero incremento de la altura máxima, una disminución en el tiempo de salida de la altura máxima y un valor superior de la relación altura máxima/tiempo, estimándose factible la discriminación entre ambas especies a través del análisis del termograma.

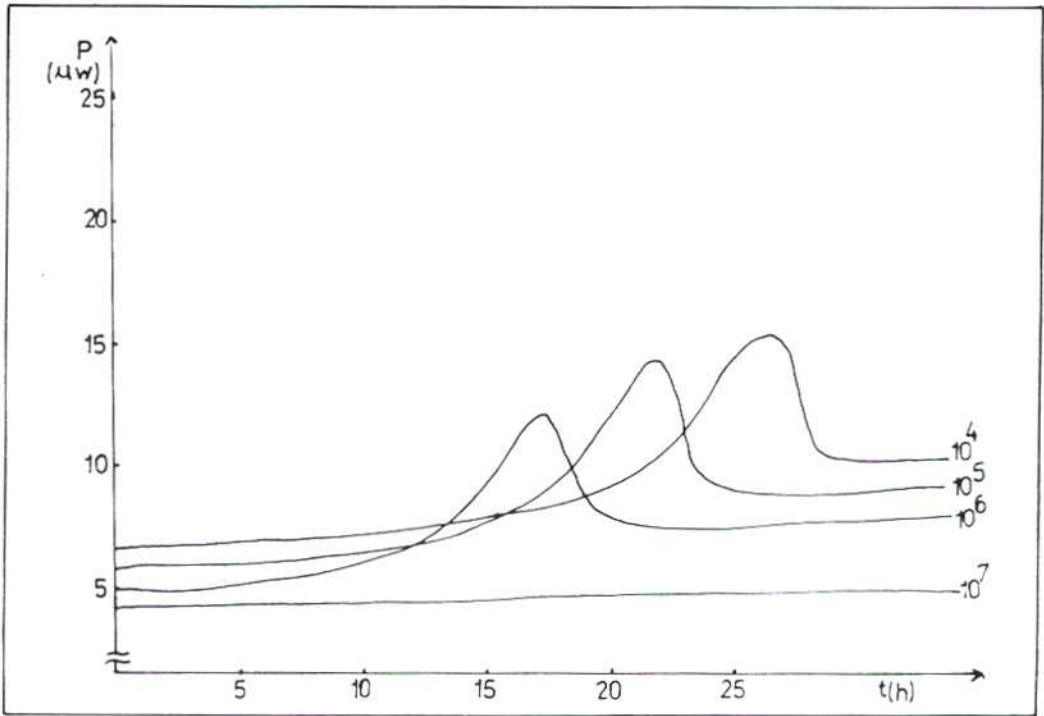
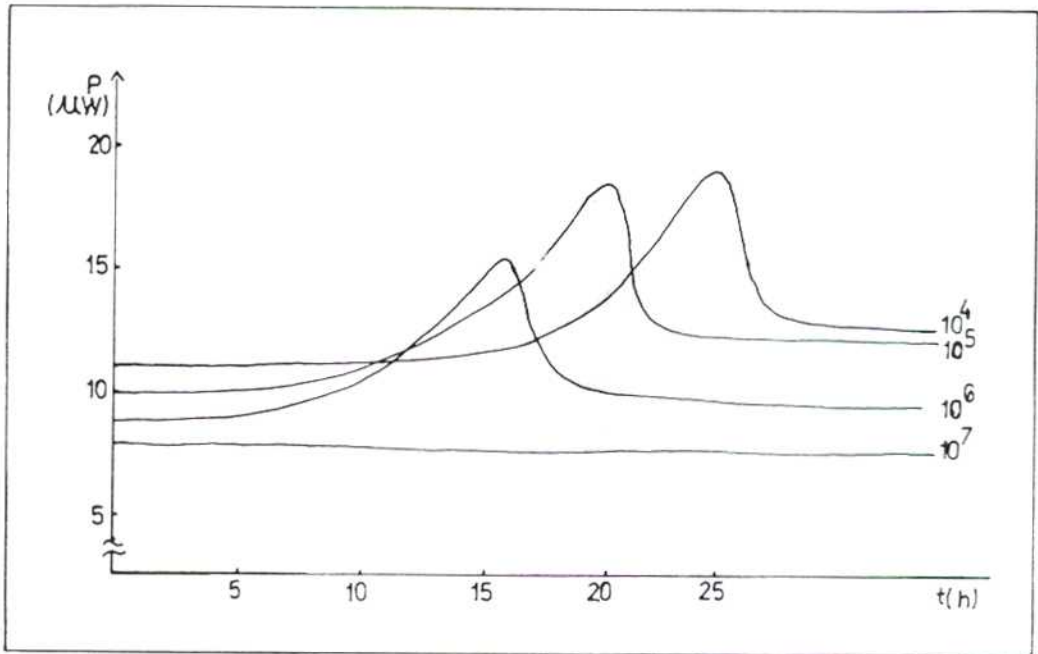
FIG. 1. Termograma correspondiente a *Mycoplasma arginini*.FIG. 2. Termograma correspondiente a *Mycoplasma hyorhinis*.

Tabla 1
ANÁLISIS MICROCALORIMÉTRICO DE LAS ESPECIES DE MICOPLASMAS ESTUDIADAS

Especie	UFC/ml	Tiempo de latencia (h)	μ (h-1)	Altura máxima (μW)	Tiempo (h)	Altura máxima/t
<i>M. arginini</i>	10 ⁴	10,0	0,49	15,0	26,7	0,56
	10 ⁵	7,3	0,61	14,0	22,2	0,63
	10 ⁶		0,78	12,0	17,5	0,68
<i>M. hyorhinae</i>	10 ⁴	14,2	0,36	19,0	24,2	0,78
	10 ⁵	10,3	0,39	18,5	20,0	0,92
	10 ⁶	5,8	0,57	15,5	15,7	0,99

En la tabla 2 se muestran los valores de las desviaciones estándares, medias y coeficientes de variación para los diferentes parámetros analizados, a partir de las réplicas de medición en el calorímetro, de la especie de *M. arginini*. Según el coeficiente de variación obtenido para cada parámetro, podemos señalar que no hay diferencias significativas entre los valores representados para cada especie de micoplasma.

Tabla 2
MEDIAS, DESVIACIONES ESTÁNDARES Y COEFICIENTES DE VARIACION PARA LOS DIFERENTES PARAMETROS ANALIZADOS

	Tiempo de latencia	Altura máxima	Tiempo	μ	Altura máxima/t
X	10,6	20,6	18,5	0,37	1,10
S	0,9	0,8	0,4	0,02	0,02
Cv	8,5	3,9	2,2	5,40	1,80

X: media; S: desviación estándar; Cv: coeficiente de variación.

El método microcalorimétrico nos permitió obtener con rapidez y exactitud el momento en que el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento, lo cual se hace engorroso cuando se emplean otros métodos. Por ejemplo, la utilización de la turbidimetría, la cual se utiliza para medir crecimiento en bacterias, en el caso de los micoplasmas es inadecuada, a causa de que estos microorganismos generalmente no producen turbidez en el medio, como resultado de su crecimiento. Por otra parte, los métodos de conteo utilizados [UFC/ml y UCC (unidad de cambio de color)], requieren un tiempo prolongado para la obtención del resultado, corroborando esto que la medida calorimétrica es mucho más precisa y el crecimiento es registrado instantáneamente y de forma continua.

Estos resultados, en nuestro caso, son de gran aplicación al utilizar dichas cepas en infecciones experimentales en células de cultivo, pues debemos conocer con exactitud el momento en que el microorganismo alcanza su velocidad máxima de crecimiento para ser capaces de infectar los cultivos.

CONCLUSIONES

Mediante la utilización del método microcalorimétrico fue posible estudiar el comportamiento de las especies de *M. arginini* y *M. hyorhina* en su crecimiento, demostrándose su precisión y rapidez en la obtención del crecimiento de las mismas, lo que se dificulta si se realiza por los métodos convencionales.

Las características de los termogramas obtenidos para cada especie, sugieren la utilización de este método en la identificación de estos organismos.

REFERENCIAS

- BOLING, E.A.; G. BLANCHARD y W. RUSSEL (1973). *Bacterial identification by microcalorimetry*. Nature **241**: 472-473.
- LEE, D.; R. MILES y A. BEEZER (1986). *Isolation and microcalorimetric characterization of glucose-negative and pyruvate-negative mutants of mycoplasma mycoides*. FEMS Microbiology **34**: 283-286.
- LIUNGHOLM, K. y I. WADSO (1976). *Microcalorimetric detection of growth of mycoplasmatales*. Journal of General Microbiology **96**: 283-288.
- Mc GARRITY, G.J.; T. STENIER y L. GAMON (1984). "Prevention, detection and control of mycoplasma infection of cell culture", en: *Handbook of mutagenicity test procedures*, Second edition (Eds. B.J. Kilbey; M. Legator; W. Nichols y C. Ramed), pp. 823-839. Elsevier, Amsterdam.
- MILES, A. y S. MISRA (1938). *The estimation of the bactericidal power of the blood*. J. Hyg. Camb. **38**: 732-735.
- MILES, R.; A. BEEZER y D. LEE (1985). *Gen Microbiol.* **131**: 1845-1852.
- MONK, P. e I. WADSO (1975). *The use of microcalorimetry for bacterial classification*. Journal of Applied Bacteriology **38**: 71-74.
- SCHMIDT, J. y V. ERFLE (1984). *Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma free cell lines*. Exp. Cell. Res. **152**: 563-570.
- STANBRIDGE, E. y E. SCHNEIDER (1977). *The need for non cultural methods for the detection of mycoplasma contaminants*. Develop. Biol. Standard. **37**: 191-200.
- WADSO, I. (1974). *A microcalorimeter for biological analysis*. Sciences Tools **21**: 18-21.