



Evaluación del daño subletal en bacterias por métodos de cultivo

Apellidos, nombre	Pérez Esteve, Édgar (edpees@upv.es) Rivas Soler, Alejandro (alriso@tal.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de los Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

Si estás leyendo este artículo es porque te interesa la microbiología de alimentos. En ese caso sabrás que la eficacia de un tratamiento de conservación de alimentos se suele determinar a través de la determinación de los microorganismos viables presentes en el mismo, y también que la viabilidad de las células bacterianas ha sido determinada, tradicionalmente, por su habilidad para crecer y formar colonias en medios de cultivo en el laboratorio. Lo que es posible que no sepas, es que además de los microorganismos viables, existen otros estados de las células bacterianas que son intermedios entre el de células intactas y células muertas. En el presente artículo te presentamos estos otros estados y además diferentes técnicas, todas ellas basadas en recuentos, para determinar con mayor precisión el efecto de un determinado tratamiento (físico o químico) sobre una población bacteriana.

2 Objetivos

Una vez leído con detenimiento este documento, serás capaz de:

- Definir el término de daño subletal.
- Diferenciar entre células intactas, subletalmente dañadas, células viables pero no cultivables y células muertas.
- Evaluar el daño subletal en bacterias aplicando diferentes métodos de cultivo.

3 Introducción

Con el objetivo de mejorar la calidad microbiológica de los alimentos, éstos son sometidos a una serie de tratamientos químicos (aplicación de productos de limpieza o desinfectantes, cambios de pH, adición de conservantes...) o físicos (calentamiento, enfriamiento, pulsos eléctricos, altas presiones...) que tienen por objetivo eliminar o reducir la carga microbiana inicial del alimento a través de someter a la misma a un estrés (ver Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de estreses que pueden sufrir los microorganismos en la industria alimentaria

Tipo de estrés	
Físico	Químico
Secado (por aire, vacío o liofilización)	Desinfectantes químicos: cloro, compuestos de amonio cuaternario,...
Calor (tratamientos suaves o subletales)	Tratamientos oxidativos: ozono, H ₂ O ₂ , ...
Refrigeración y congelación	Uso de ácidos y bases
Altas Presiones, Pulsos Eléctricos	Conservantes: sorbato, nitrato, ...
Radiación	Antimicrobianos naturales
Presión osmótica	

Si el tratamiento es suficientemente intenso, las bacterias pierden su viabilidad de manera permanente y mueren. Sin embargo, si este tratamiento no es suficientemente intenso, se pueden dar diferentes situaciones en función de la magnitud del estrés.

En función de la magnitud del estrés, el microorganismo responderá de una manera diferente. Usamos la palabra "suave o leve" para describir los niveles de estrés que no dan como resultado la pérdida de viabilidad, pero reducen o detienen su tasa de crecimiento. El estrés "moderado" no solo detiene el crecimiento microbiano, sino que también provoca cierta pérdida de viabilidad celular. "Extremo" o "severo" describe un nivel de estrés que normalmente es letal para las células, lo que resulta en la muerte de la mayoría de la población (**Figura 1**).

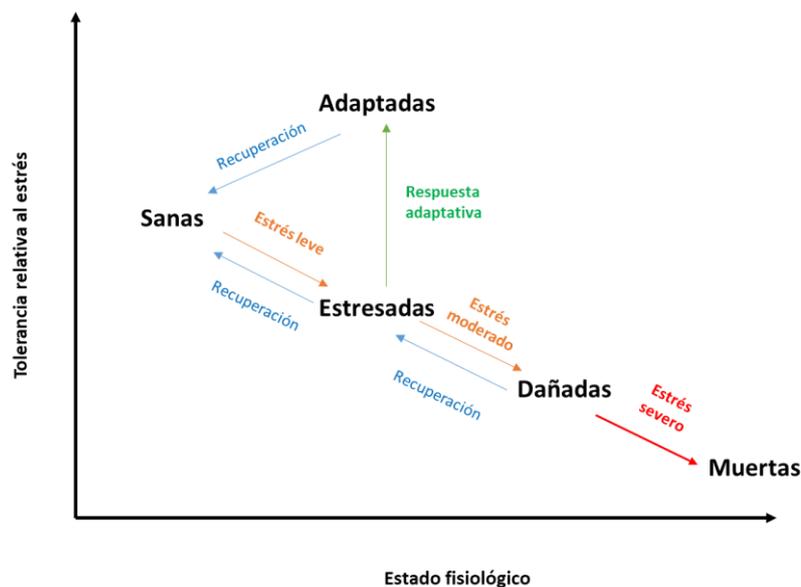


Figura 1. Relación entre estados fisiológicos de microorganismos sujetos a diferentes niveles de estrés

De esta manera, podemos encontrar 4 situaciones que conducen a diferentes estados de la célula:

- Las células quedan intactas, sin sufrir ningún tipo de daño o alteración. Las llamaremos **células intactas o viables**.
- Las células sufren un daño reversible, pudiendo recuperar su capacidad para multiplicarse tras un determinado periodo de recuperación en condiciones adecuadas. A estas células se les conoce como **células subletalmente dañadas**.
- Las células sufren un daño por el que pierden su capacidad para multiplicarse en los medios de cultivo usuales, pero conservan su actividad metabólica. A estas células se les conoce como **células viables no cultivables**.
- Las células pierden su integridad y actividad metabólica y mueren, dando lugar a **células muertas**.



3.1 Daño subletal

El daño subletal ocurre al exponer los microorganismos a estreses físicos y químicos no letales que causan alteraciones reversibles a nivel funcional y estructural. Estas células dañadas se recuperan si están en un medio adecuado, siendo por tanto un daño reversible. Durante el proceso de recuperación en medios adecuados, en primer lugar, hay un proceso de reparación del daño seguido de un proceso de multiplicación de las células.

Una de las características de las células subletalmente dañadas es su incapacidad de crecimiento en los medios selectivos usados habitualmente en el análisis microbiológico de alimentos. Por tanto, la utilización de este tipo de medios, no estaría cuantificando la presencia de bacterias subletalmente dañadas en el alimento.

Puesto que los microorganismos que han padecido un daño subletal son potencialmente capaces de recuperarse y multiplicarse, podrían acabar produciendo enfermedades (patógenos) o reduciendo la vida útil del alimento (alteradores).

Por tanto, no cuantificar a este tipo de células podría acabar en la comercialización de alimentos que contienen patógenos o alteradores dañados por encima de los límites establecidos. Estos alimentos podrían ser peligrosos y/o tener una vida útil menor a lo esperado a pesar de cumplir con las normas y especificaciones reglamentarias.

Para evitar estos problemas, se ha de incorporar una breve **fase de reparación** antes de los procedimientos de detección selectiva de microorganismos en los alimentos.

3.2 Microorganismos viables pero no cultivables (VBNC)

Dentro de la población de células dañadas, además de las células subletalmente dañadas, podemos encontrarnos unas células en estado **viable pero no cultivable (VBNC)**. Es un estado fisiológico intermedio entre la célula subletalmente dañada y la célula muerta. Las células VBNC muestran una actividad metabólica baja pero detectable, mantienen la integridad de la membrana y expresan genes a niveles bajos, pero son incapaces de formar colonias en los medios de cultivo.

Entonces, ¿en qué se diferencian las células dañadas de las células VBNC? La diferencia entre las células dañadas y las células VBNC es su capacidad para formar colonias. Mientras las dañadas pueden formar colonias en medios no selectivos (pero no en medios selectivos), las células VBNC no pueden formar colonias en ningún tipo de medio de cultivo, a no ser que sean sometidas a un proceso de recuperación. El proceso de recuperación de células VBNC se llama **reanimación** y describe la transición del estado no cultivable al cultivable sin ningún cambio en el número de células, es decir, sin multiplicación celular. La reanimación puede desencadenarse, por ejemplo, por cambios de concentración de nutrientes, de temperatura, por adición de estímulos químicos, etc.

El estado VBNC es considerado como una estrategia de supervivencia de los microorganismos. Se producen cambios a nivel morfológico y metabólico, reducción de la virulencia e incluso pueden generar resistencia a antibióticos.

Por tanto, de igual modo que las células subletalmente dañadas, las células VBNC, debido a su capacidad de persistir, multiplicarse y recuperar su resistencia, tienen un impacto significativo en la seguridad alimentaria. En la industria alimentaria, la monitorización de la presencia de microorganismos patógenos se realiza habitualmente mediante técnicas de cultivo, sin embargo, no son técnicas adecuadas para detectar microorganismos VBNC. Las técnicas adecuadas para la detección de VBNC se basan en la detección de actividad metabólica, la detección de respiración, la detección de ácidos nucleicos, la tinción citoquímica, entre otros. Por eso, no será objeto del presente artículo.

4 Métodos para la evaluación de microorganismos dañados

4.1 Cuantificación de células dañadas mediante técnicas de cultivo

Como se ha visto, las células subletalmente dañadas no son capaces de formar colonias en medios selectivos, pero tienen la capacidad de recuperar su estado fisiológico normal en condiciones favorables. En base a lo anterior se puede cuantificar el daño mediante una doble siembra, en medio selectivo (no crecen las dañadas, solo las intactas) y en no selectivo (crecen las intactas y las dañadas).

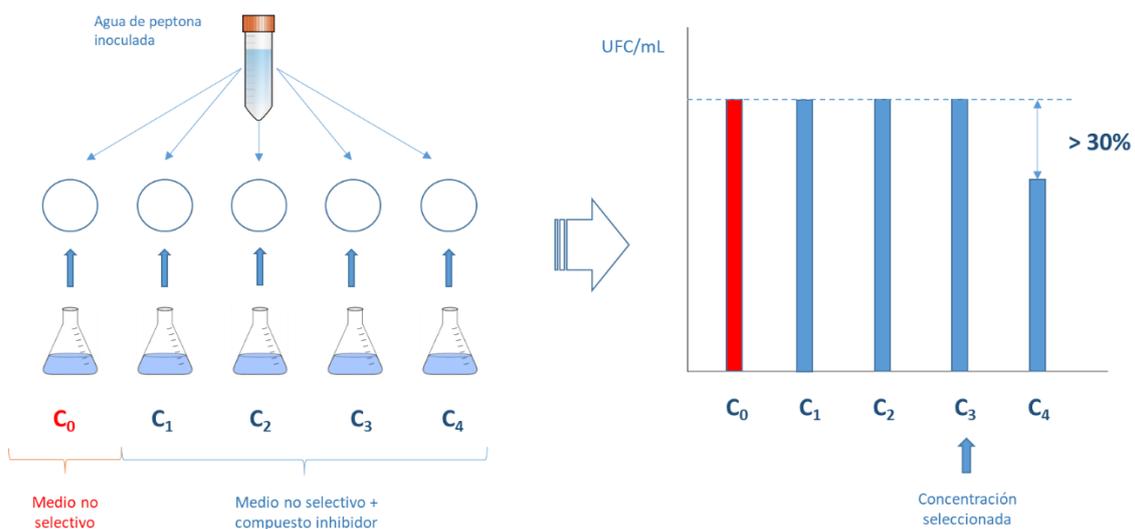


Figura 2. Método para diseñar un medio selectivo

Para ello, en primer lugar, se debe preparar el medio selectivo (**Figura 2**). En estos medios, hay diferentes tipos de compuestos que pueden inhibir el crecimiento de las células dañadas (sales, ácidos, antibióticos, ...). En función del tipo de microorganismo y del tipo de estrés se elegirá el tipo de compuesto inhibidor o selectivo. El objetivo es encontrar la concentración del compuesto selectivo, a partir de la cual, el compuesto tenga un efecto letal para la bacteria. Para ello, en primer lugar, se preparan medios de cultivo no selectivos (TSA, PCA, agar nutritivo, ...) con concentraciones crecientes del compuesto inhibidor.



A continuación, se inocula agua de peptona con el microorganismo objetivo en los diferentes medios preparados (C_0, C_1, C_2, \dots) y se siembra en masa o en superficie. Una vez sembradas se incuban y se realizan los recuentos. A partir de los recuentos, se determina qué medio tiene una concentración de compuesto tal que tenga efectos letales sobre la bacteria (recuentos inferiores al 70% del recuento en medio sin compuesto (C_0)). En el ejemplo de la **Figura 2**, éste sería el medio C_4 . A continuación, se selecciona el medio con la concentración inmediatamente inferior (C_3), en cual crecerían las colonias intactas, pero impediría el crecimiento de las células dañadas (medio selectivo).

Para calcular el número de microorganismos dañados presentes en una muestra sometido a un estrés se realizará una doble siembra en dos medios de cultivo (selectivo y no selectivo) y por diferencia de recuento sabremos el número final de células dañadas.

Caso práctico

*Se quiere evaluar el efecto antimicrobiano de un extracto vegetal en leche. Para ello, a una muestra de leche se le ha adicionado el extracto, se ha inoculado con *E. coli* y se ha almacenado a 8°C durante 24 horas. Tras las 24 horas, se ha sembrado la leche en medio selectivo (TSA) y no selectivo (TSA+NaCl) y se ha incubado. La tabla 2 muestra los recuentos obtenidos. Calcula el porcentaje de células muertas, vivas-intactas y vivas dañadas de *E. coli* debido al tratamiento.*

Tabla 2. Efecto antimicrobiano de un extracto vegetal en *E. coli*.

Medio de siembra	Tipo de medio	UFC/mL	
		0 horas	24 horas
TSA	No selectivo	252×10^5	26×10^5
TSA + NaCl	Selectivo	245×10^6	6×10^5

La población muerta se obtendría por diferencia de recuento de las colonias en TSA a 0 y 24 horas ($252 \times 10^5 - 26 \times 10^5 = 226 \times 10^5$ (89.7%)). La población viva total (intactas + dañadas) es el recuento de colonias en TSA (26×10^5 ufc/mL (10.3 %)). La población viva no dañada es el recuento en TSA+NaCl (6×10^5 ufc/mL (23 % de la población viva total)) y la población dañada es la diferencia entre la población viva total y la intacta ($26 \times 10^5 - 6 \times 10^5 = 20 \times 10^5$ (77 % de la población viva total)).

4.2 Evaluación de la reparación mediante técnicas de cultivo

Una de las características más importantes de las células dañadas es la capacidad de recuperarse del daño en un ambiente adecuado. La velocidad de reparación se puede determinar durante la incubación de las células dañadas en un caldo no selectivo (p.e. agua peptonada) sembrando simultáneamente en dos medios diferentes (selectivo y no selectivo). El medio selectivo se puede preparar según el apartado 4.1.



La **Figura 3** muestra la evolución de los recuentos en placa (en medio sólido selectivo y no selectivo) de la población bacteriana al ser sometidas a un estrés y a una posterior incubación en un caldo no selectivo. Para determinar las diferentes subpoblaciones (intactas, dañadas o muertas), las muestras incubadas se siembran a diferentes tiempos de incubación en dos medios de cultivo (selectivo y no selectivo).

Inmediatamente después del tratamiento, sembrando la muestra en un medio no selectivo, sabremos la población total viva y la muerta y sembrando la muestra en un medio selectivo, sabremos la población viva pero dañada (ver 4.1). Si la muestra tratada la ponemos a incubar en un caldo no selectivo, entonces las células dañadas se irán recuperando y, por tanto, su número irá disminuyendo. En la **figura 3** se observa en la evolución de las líneas roja y azul. La línea roja representa la evolución de los recuentos en medio no selectivo y la línea azul la evolución de los recuentos en medio selectivo. Llegará un momento donde las líneas se solapan, lo cual querrá decir que ya no hay células dañadas, sino que se han recuperado completamente.

A partir de un cierto tiempo de incubación, los recuentos comenzarán a incrementarse, indicativo del comienzo de la fase de multiplicación celular.

La línea verde indica la evolución de los recuentos en condiciones que impiden la recuperación de las células dañadas (p.e. temperaturas bajas de incubación).

Las características que debe tener un medio de reparación de las células subletalmente dañadas son:

- El medio debe ser no-selectivo. No debe contener ningún compuesto que tenga un efecto inhibitorio sobre el microorganismo. La presencia de compuestos selectivos no solo impide la reparación incluso puede provocar la muerte del microorganismo.
- Debe contener los nutrientes necesarios (fuente de N y C y vitaminas) para el proceso de reparación. En general, un medio rico en nutrientes produce una reparación más rápida y en mayor cantidad que un medio pobre en nutrientes. Una suplementación con catalasa y piruvato (destruye el H_2O_2 producido por las bacterias) mejora el proceso de reparación.
- La reparación del microorganismo depende del pH del medio y de la temperatura de incubación. En general, el medio debe tener un pH cercano a 7 y estar a una temperatura de incubación entre 30 y 37°C.

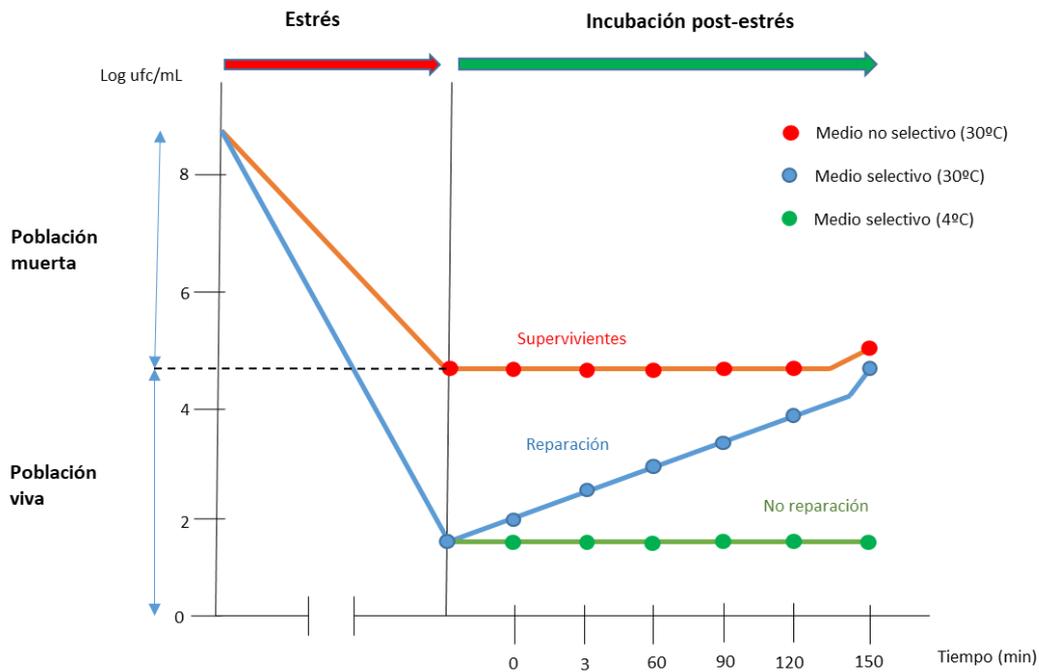


Figura 3. Evolución de los recuentos bacterianos para una misma cepa y tipo de estrés obtenidos con diferentes métodos de recuento en placa

4.3 Métodos de reparación de células dañadas

En aquellos casos donde se sabe que el tratamiento produce un daño subletal, para poder cuantificar todas las células que, tras un tiempo de reparación volverán a ser viables, es necesario aplicar un método de reparación. Estos métodos pueden ser de dos tipos: método líquido o método sólido.

Método líquido de reparación

Básicamente se trata de inocular un caldo no selectivo con el microorganismo que se quiera estudiar e incubar en condiciones óptimas para su reparación (**Figura 4**). Éstas tienen que ser las condiciones de incubación adecuadas para la reparación de las células dañadas, pero sin llegar a las de multiplicación de las células intactas. Indirectamente se puede cuantificar el daño si se hace una siembra en medio selectivo antes y después de la incubación. La diferencia en el recuento es el número de células dañadas (ver 4.1).

Esta reparación podría usarse como el paso inicial en el aislamiento selectivo, seguido de la enumeración mediante placa directa o mediante la técnica del número más probable (NMP) para bacterias patógenas e indicadoras de los alimentos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en alimentos no estériles, tras la recuperación, los recuentos obtenidos pueden deberse, además de la recuperación de las dañadas, a un crecimiento de las intactas y de la flora propia del alimento. Generalmente, este método de reparación se usa como primer paso en los métodos de detección de patógenos en alimentos (p.e. ausencia de *Salmonella* en 25 g en preparados cárnicos).

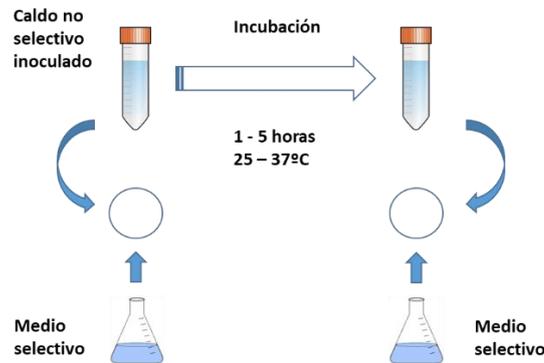


Figura 4. Método líquido de reparación

Métodos sólidos de reparación

En los métodos sólidos tradicionales de reparación (**Figura 5 izquierda**), el microorganismo dañado se siembra en una placa Petri con medio no selectivo (siembra en masa o en superficie) y se incuba durante un tiempo (1–4 h) y una temperatura (25–37°C) adecuados para facilitar su reparación. Tras la reparación, las placas se cubren con 7–12 mL de un medio de agar selectivo (específico para el tipo de microorganismo objetivo), se dejan solidificar y luego se incuban. Durante la incubación, los compuestos inhibidores del medio selectivo se difunden a través del medio no selectivo y crearán un entorno selectivo. Debido a que las células ya han sido reparadas, no son inhibidas por los agentes selectivos, se multiplicarán y formarán colonias. Además, solo formarán colonias los microorganismos objetivo específicos del medio selectivo.

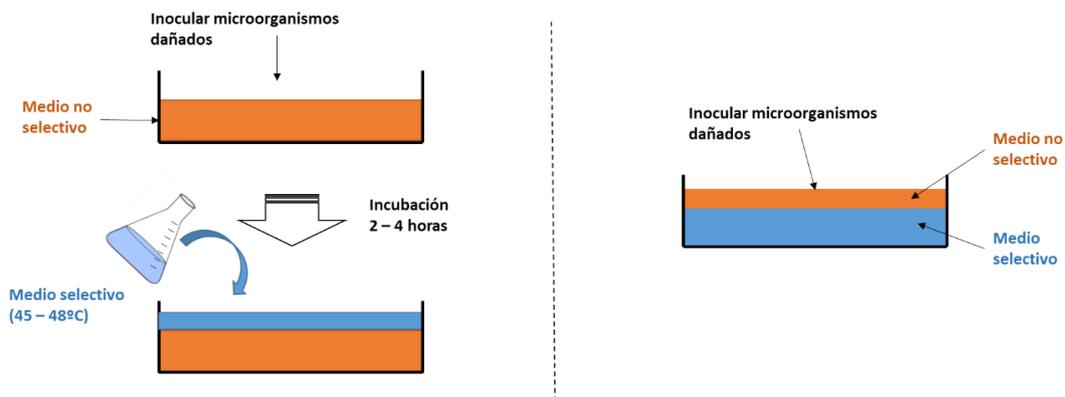


Figura 5. Método sólido tradicional de reparación (izquierda) y de capa fina (TAL) (derecha).



Se han desarrollado otros métodos sólidos de reparación más sencillos. Uno de ellos es el método de capa fina (Thin agar layer (TAL)) (**Figura 5 derecha**). Este método consiste en incorporar una capa fina de medio no selectivo (p. e. TSA) a una placa Petri con medio selectivo solidificado. El medio no selectivo se inoculará con el microorganismo dañado. La capa superior (TSA) proporciona un ambiente favorable para que las células dañadas se recuperen y se vuelvan funcionalmente normales en las primeras horas de incubación. Luego, los microorganismos objetivo dañados y recuperados pueden interactuar con los agentes selectivos en la capa inferior para desarrollar reacciones típicas mientras que otros microorganismos son inhibidos por los agentes selectivos.

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos revisado el concepto de daño subletal, así como la importancia de su determinación para no subestimar la presencia de microorganismos que podrán acabar alterando el alimento o produciendo una enfermedad en el consumidor. Además, mediante la resolución de los diferentes casos prácticos propuestos, habrás podido autoevaluar tu grado de comprensión. Si hay algún aspecto que no has entendido bien o sobre el cual te gustaría profundizar más, te recomendamos que consultes la bibliografía que proponemos al final del artículo.

6 Bibliografía

Babu, D., Kushwaha, K., Juneja, V.K. Viable but nonculturable. Encyclopedia of food microbiology, volume 3, 686-689.

Begley M, Hill C. Stress adaptation in foodborne pathogens. Annu Rev Food Sci Technol. 2015;6:191-210.

Schottroff F, Fröhling A, Zunabovic-Pichler M, Krottenthaler A, Schlüter O and Jäger H (2018) Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-thermal Processes. Front. Microbiol. 9:2773.

Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. J Food Prot. 2009 May;72(5):1121-38.

Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. Food Microbiology 25: 735-744.