

# Establecimiento de protocolos de cultivo y mantenimiento de *Acanthamoeba castellanii*

## *Establishment of culture and maintenance protocols for Acanthamoeba castellanii*

Daniela Román-Cáceres<sup>1,\*</sup>, Ana Claudia Samaniego-Villacís<sup>1</sup>, Adamary Vásquez<sup>1</sup> y Jorge Armijos-Rivera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación de Genética y Biología Molecular, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

\* Autor para correspondencia: daniela.roman@unl.edu.ec

Fecha de recepción del manuscrito: 04/04/2023

Fecha de aceptación del manuscrito: 20/12/2024

Fecha de publicación: 31/12/2024

**Resumen**—El género *Acanthamoeba* abarca diversas especies de amebas de vida libre, se aíslan con frecuencia de distintas fuentes ambientales como el agua, el suelo y el aire. Varias especies son conocidas por causar infecciones y enfermedades en humanos y animales. Además, amebas como *Acanthamoeba castellanii* se reconoce como un relevante reservorio de virus, brindándoles protección contra condiciones ambientales adversas, en particular de virus del tipo nucleocitoplasmáticos de gran tamaño, también llamados virus gigantes, los cuales pueden ser aislados mediante la inoculación directa de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* con muestras de agua de cuerpos lacustres. Este estudio se centró en establecer protocolos de cultivo en laboratorio para *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, con el objetivo de comprender mejor la respuesta de estas amebas al entorno y sus interacciones con depredadores de protozoos. Desarrollamos y aplicamos un enfoque para evaluar la viabilidad de este género en un medio líquido de proteasa-peptona-glucosa y un medio sólido no nutritivo, utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922 como sustrato. La incubación a temperaturas específicas y un mantenimiento regular permitieron establecer cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. Mediante la observación bajo un microscopio invertido (10x y 40x), se verificó el crecimiento de *Acanthamoeba*, confirmando el estado de trofozoitos de las células y la presencia de la vacuola amebal en ambos tipos de cultivo.

**Palabras clave**—*Acanthamoeba castellanii*, *Escherichia coli*, cultivos axénicos, medio PYG.

**Abstract**—The genus *Acanthamoeba* encompasses various species of free-living amoebas, often isolated from different environmental sources such as water, soil, and air. Several species are known to cause infections and diseases in both humans and animals. Additionally, amoebas like *Acanthamoeba castellanii* are recognized as significant reservoirs of viruses, providing protection against adverse environmental conditions, especially nucleocytoplasmic large DNA viruses, also known as giant viruses. These viruses can be isolated by directly inoculating *Acanthamoeba castellanii* cultures with water samples from lacustrine bodies. This study focused on establishing laboratory cultivation protocols for *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, aiming to better understand the response of these amoebas to the environment and their interactions with protozoan predators. We developed and implemented an approach to assess the viability of this genus in a liquid medium of protease-peptone-glucose and a non-nutritive solid medium, using *Escherichia coli* ATCC 25922 as a substrate. Incubation at specific temperatures and regular maintenance allowed for the establishment of axenic cultures of *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. Through observation under an inverted microscope (10x and 40x), the growth of *Acanthamoeba* was verified, confirming the trophozoite state of the cells and the presence of the amoebal vacuole in both types of culture.

**Keywords**—*Acanthamoeba castellanii*, *Escherichia coli*, axenic cultures, PYG medium.

## INTRODUCCIÓN

El género *Acanthamoeba* se descubrió en 1931 (Weisman, 1976), describiéndose como amebas caracterizadas por su morfología de trofozoitos y quistes, lo que llevó a grandes confusiones durante mucho tiempo en la literatura sobre su nomenclatura y estado taxonómico (Weisman, 1976). Posteriormente, en 1975 se posicionó al género *Acanthamoeba* en el esquema taxonómico de la Sociedad de Protozoólogos (Visvesvara, 1991) y desde entonces se cono-

ce que estas amebas de vida libre están adaptadas para vivir en una variedad de entornos naturales y entornos creados por actividades humanas (Caumo *et al.*, 2014). Estas *Acanthamoeba* se aíslan con frecuencia de distintas fuentes ambientales, como el agua, el suelo, el polvo y el aire, y son capaces de resistir condiciones extremas como tiempo prolongado de desecación, temperatura alta/baja, ambientes alcalinos o ácidos y exposición elevada a radiación (Landell *et al.*, 2013). Es así como este género ha ido ganando atención de la comu-

nidad científica a lo largo de los años, debido a sus roles versátiles en el ecosistema. Adicionalmente, se han identificado unas 24 especies dentro del género, de las cuales, varias se consideran como importantes patógenos humanos: *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. healyi* y *A. byersi* (Landell *et al.*, 2013).

Por otra parte, *Acanthamoeba spp.* son considerados un importante reservorio de bacterias, virus y hongos, ya que estos microorganismos se protegen de las condiciones ambientales desfavorables dentro del sistema celular de *Acanthamoeba spp.* (Siddiqui y Khan, 2012).

Posteriormente, los microorganismos regresan al medio ambiente con implicaciones de interacciones parásito-parásito, que pueden contribuir a la evolución y transmisión exitosa de microorganismos en el medio ambiente. Sin embargo, la naturaleza exacta de la simbiosis y el beneficio que representan para las amebas anfitrionas aún no están claros (Greub y Raoult, 2004).

Según Siddiqui y Khan (2012), el género *Acanthamoeba* desempeña dos funciones ecológicas principales en el suelo: el reciclaje de nutrientes y la formación de la estructura de la comunidad microbiana. En general, *Acanthamoeba* puede desarrollar una función importante en la regulación de las poblaciones, contribuyendo al comportamiento de los ecosistemas (Greub y Raoult, 2004).

El ciclo de vida de *Acanthamoeba spp.* se divide en dos etapas: el trofozoito y el quiste. Los tamaños de los trofozoitos y quiste varían entre las diferentes especies de *Acanthamoeba* (Siddiqui y Khan, 2012). Tanto el trofozoito como el quiste se caracterizan por un solo núcleo que tiene un gran nucléolo denso y central. Cuando el trofozoito se divide rápidamente por mitosis, la membrana nuclear y el nucléolo desaparecen. El trofozoito, cuando se encuentra en condiciones desfavorables, se enquistas y dichos quistes pueden tener una morfología variada pudiendo ser poliédricos o convexos con paredes dobles; cuando el quiste es externo se conoce como ectoquiste y endoquiste cuando es interno (Świderski, 2009).

El género *Acanthamoeba* se alimenta de microorganismos presentes en superficies, en diversos ambientes (Khan, 2006) e incluso en la interfase aire-agua conocida como zona pelágica (Siddiqui y Khan, 2012). Las estructuras espinosas o acanthopodia que surgen de la superficie de los trofozoitos de *Acanthamoeba* pueden usarse para capturar partículas de alimentos, que generalmente son bacterias (Świderski, 2009), pero también se alimentan de algas, levaduras (Khan, 2006) y otros protistas. La absorción de nutrientes, solutos etc. en *Acanthamoeba* se produce por fagocitosis y pinocitosis. Estas amebas pueden tomar solutos de diferentes pesos moleculares, incluyendo albúmina (Mw 65 000), inulina (Mw 5000), glucosa (Mw 180) y leucina (Mw 131) ((de Souza Gonçalves *et al.*, 2018). Posteriormente a la absorción de partículas, *Acanthamoeba* exhibe la capacidad de distinguir vacuolas que contienen partículas digeribles e indigeribles. Por ejemplo, Bowers y Olszewski (1983) demostraron que el destino de las vacuolas dentro de *Acanthamoeba* depende de la naturaleza de las partículas. Adicionalmente, estudios sobre la absorción de partículas en *Acanthamoeba* sugieren que es un proceso complejo que puede desempeñar un papel importante tanto en la supervivencia como en la patogenicidad de estos organismos (de Souza Gonçalves *et al.*, 2018).

Los trofozoitos de *Acanthamoeba spp.* se han utilizado ampliamente como sistemas modelo para estudiar la biología de las células eucariotas, debido a su tamaño relativamente grande, rápido crecimiento en cultivo y motilidad activa (Caumo *et al.*, 2014). El citoesqueleto bien desarrollado de estos organismos los convierte en modelos especialmente buenos para comprender la motilidad basada en el citoesqueleto de actina y otros aspectos moleculares de motilidad celular (Siddiqui y Khan, 2012).

Por otra parte, estudios de proteómica para *Acanthamoeba spp.* en etapa de trofozoito han determinado la variedad de proteínas expresadas por especies de este género, lo que ha ayudado a dilucidar los mecanismos moleculares de interacción con las especies huésped y a identificar posibles biomarcadores para el diagnóstico y dianas para el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas (Khan, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el género *Acanthamoeba* en ambientes naturales suele alimentarse de bacterias, levaduras, pequeños protozoos, entre otros, por lo que cualquiera de ellos puede ser usado como sustrato de crecimiento en condiciones de laboratorio. Siddiqui y Khan (2012) mencionan que existen algunos problemas cuando se usan levaduras y pequeños protozoos como sustrato de crecimiento debido a la complejidad de la preparación del medio. Sin embargo, las sustancias orgánicas como la glucosa, la peptona u otros sustratos proporcionan nutrientes ricos para organismos no deseados, es decir, levaduras, hongos, otros protozoos y bacterias. Para superar estos problemas técnicos y maximizar la probabilidad de aislar únicamente *Acanthamoeba* de muestras ambientales y clínicas, se han desarrollado protocolos utilizando ensayos de placas petri con bacterias Gram negativas como sustrato para obtener un gran número de trofozoitos de *Acanthamoeba* para estudios bioquímicos. Las bacterias Gram negativas más utilizadas son *Escherichia coli* o *Klebsiella aerogenes* que se siembran en la placa de agar sin nutrientes como fuente de alimento para *Acanthamoeba*. El agar sin nutrientes contiene nutrientes mínimos y, por lo tanto, inhibe el crecimiento de organismos no deseados (Khan *et al.*, 2002).

*Acanthamoeba* se puede cultivar 'axénicamente' en ausencia de organismos alimentarios vivos externos. Esto generalmente se conoce como cultivo axénico para indicar que no hay otros organismos vivos presentes. Sin embargo, se considera que es posible que los cultivos de *Acanthamoeba* nunca sean verdaderamente axénicos, ya que pueden contener bacterias vivas que sobreviven internamente como endosimbiontes (Siddiqui y Khan, 2012). En este sentido, en condiciones de laboratorio, el crecimiento axénico se logra utilizando medio líquido PYG (Khan, 2001).

A pesar de su distribución extensa en la naturaleza y su relevancia ecológica, en Ecuador, las investigaciones sobre este género de amebas son limitadas, lo que resulta en una falta de métodos estandarizados para su cultivo. La carencia de estudios específicos ha llevado a la ausencia de protocolos establecidos y a una brecha de conocimiento significativa. Este vacío en la investigación plantea preguntas fundamentales sobre los métodos de cultivo y sus limitaciones, ya que no se han delineado claramente. Establecer protocolos y comprender las posibles restricciones en caso de su existencia se convierte, por tanto, en una necesidad imperante para abordar este vacío y avanzar en el interés científico en torno a

estos protozoos en Ecuador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ■ **Obtención de cepas *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010.**

La cepa Neff, ATCC 30010, fue donada por la Dra. Karin Silva Caumo del grupo de Investigación de Protozoarios Emergentes y Oportunistas y el Laboratorio Didáctico de Parasitología Clínica de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil; fueron enviadas en viales de 1,5 ml a temperatura ambiente.

### ■ **Medios de cultivo para *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

Los medios de cultivo son un requisito indispensable que se emplea para propagar las células de microorganismos, de este dependerá el crecimiento y rapidez de reproducción de las mismas. Las cepas de *Acanthamoeba castellanii* no son la excepción, y se ha encontrado en la literatura algunos de los medios empleados para su cultivo, los más relevantes son el medio líquido de proteasa-peptona-glucosa (PYG) para los cultivos axénicos, es decir, los cultivos de la cepa amebal, y el medio agar no-nutritivo como medio sólido que se vierte en placas petri para cultivos monoxénicos, es decir, cultivo de la cepa amebal en presencia de otras células, ya sean bacterianas o virales. Para estos medios se necesitó una serie de reactivos tales como sulfato de magnesio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato amónico ferroso, fosfato dihidrógeno de potasio, glucosa, extracto de levadura y peptona (Machado et al., 2022). En el mercado existen fórmulas preparadas de estos medios, en especial del PYG, pero, pese a ello, en su mayoría son para el cultivo de bacterias y cabe recalcar que las cantidades de los reactivos difieren notablemente para la siembra de amebas, por lo que en esta investigación se buscaron las medidas adecuadas para obtener un crecimiento óptimo de la cepa ATCC 30010. Además, para la elaboración del medio de cultivo sólido, se necesitó una preparación adicional conocida como solución salina amebal. Esta etapa también implicó una evaluación detallada para determinar las cantidades apropiadas, así como la incorporación de gentamicina para prevenir el crecimiento de otros microorganismos no deseados. La base para establecer las proporciones adecuadas se derivó de un análisis cuidadoso y consideración de los requisitos específicos del medio, asegurando así la eficacia y selectividad del cultivo.

### ■ **Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 para ser usado como sustrato de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

*Acanthamoeba* puede interactuar con una serie de microorganismos, no solo virus, sino también levaduras, algas e inclusive bacterias. Sin embargo, el mecanismo de acción de la ameba frente a las bacterias es la depredación. Estudios indican que al poner en contacto a *A. castellanii* ATCC 30010 en un medio con *E. coli* ATCC 25922 existirá una invasión por parte de la cepa amebal (Yousuf et al., 2013). Así mismo se indica que para el

aislamiento de *Acanthamoeba* es necesario enriquecer el medio en el que se la cultive con cepas de bacterias de *E. coli*, pues estas servirán como sustrato de la ameba (Attariani et al., 2020)).

En este sentido, se realizaron cultivos de *E. coli* ATCC 25922, se sembró 1 l de inóculo microbiano en medio agar nutritivo mediante siembra por agotamiento en estrías, se incubó a 30 °C por 24 horas siguiendo la metodología de Anjum et al. (2021).

### ■ **Inactivación de *Escherichia Coli* ATCC 25922 para ser usado como sustrato de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

Para que *E. coli* ATCC 25922 sirva como sustrato de *A. castellanii* ATCC 30010 debió ser inactivada, para evitar que el crecimiento de la bacteria inhibiera la reproducción de la ameba. Se emplearon tubos Falcon de 15 ml donde se colocó 5 ml de agua de peptona. Luego con ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia de la placa de agar nutritivo con cultivo de la bacteria, seguido a esto se colocó el asa en posición vertical y se dejó caer la colonia tomada en el tubo con peptona. Se dejó incubar a 30 °C por 24 horas. Una vez que se comprobó el crecimiento de *E. coli* se tomó 1 ml del cultivo líquido y se colocó en viales de 1,5 ml, los mismos se llevaron a baño María a 56 °C por 2 horas Lee y Kaletunç (2010).

### ■ **Cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

Con una pipeta de 100 l, se vertió sobre la placa con agar no-nutritivo 75 l de inóculo de amebas ATCC 30010 y 75 l de *E. coli* ATCC 25922 inactivas. Las cajas fueron selladas y etiquetadas con la fecha en la que se realizó, se dejó incubar por 4 días a 30 °C, transcurrido este tiempo se observó el crecimiento amebal con ayuda de un microscopio invertido.

### ■ **Almacenamiento de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010**

Se sembraron amebas ATCC 30010 en un frasco de cultivo celular (T-75) en medio PYG y se incubaron a 27 °C hasta que se formara una monocapa en el fondo del frasco. A partir de estos cultivos, se obtuvieron muestras para el almacenamiento, separando las amebas por medio del método de congelación. Para ejecutar este último, se debió reemplazar el medio por 2 ml de PYG fresco, luego el frasco de medio celular se llevó a congelar a -20 °C por 10 min, posteriormente se tomó 1 ml del contenido y se colocó en tubos tapa rosca y se almacenaron en el refrigerador a 8 °C (Machado et al., 2022).

## RESULTADOS

### *Protocolo de cultivo axénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010*

#### *Protocolo de cultivo e inactivación de *E. coli* ATCC 25922*

1. Preparar medio de cultivo (se puede preparar Agar nutritivo).

2. Con ayuda de la probeta tomar 1000 ml de agua destilada.
  3. Colocar el agua destilada en un matraz de 1000 ml junto con el medio que se pesó y disolver todo en el agua.
  4. Colocar el matraz en la plancha caliente y también dejar agitar durante 15 min para homogeneizar el medio del cultivo.
  5. Llevar a la autoclave a 120 °C durante 20 min.
  6. Una vez que sale de la autoclave colocar en cajas petri en un ambiente estéril.
  7. Para la inactivación de *E. coli* se emplean tubos Falcon de 15 ml donde se debe colocar 5 ml de agua de peptona.
  8. Con ayuda de un asa de siembra tomar una colonia de la placa con cultivo de *E. coli* en medio sólido (agar nutritivo).
  9. Colocar el asa en posición vertical y dejar caer la colonia de *E. coli* en los tubos con peptona. Tener cuidado, el asa no deberá tocar las paredes del tubo.
  10. En caso de que la colonia no se desprenda con facilidad se puede dar movimientos de agitación dentro del tubo hasta que caiga.
  11. Dejar los tubos en la incubadora a una temperatura de 30 °C por aproximadamente 24 horas (los mismos deben estar sellados con parafilm).
  12. Comprobar el crecimiento de *E. coli* en el medio líquido.
  13. Tomar el contenido de los tubos y colocar a aproximadamente 1 ml en viales de 1,5 ml, los mismos deben estar sellados con parafilm.
  14. Llevar a baño María los viales a una temperatura de 56 °C por dos horas.
  15. Culminado el proceso *E. coli* estará inactiva.
4. Añadir los reactivos restantes al matraz de 500 ml en el orden que se ha mencionado previamente y disolver en aproximadamente 300 ml de agua destilada.
  5. Verter la preparación de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en el frasco que contiene los reactivos disueltos restantes.
  6. Luego se coloca en una plancha caliente el matraz con la solución para facilitar la homogeneización.
  7. Llevar la solución al autoclave a 121 °C durante 20 min.
  8. Colocar 5 ml de contenido de amebas (en medio PYG) en tubos de 15 ml.
  9. Llevar los tubos a la centrífuga a 15 rpm por 5 min.
  10. Se obtiene un sobrenadante el cual se desecha.
  11. El pallet de amebas se deja en los mismos tubos y se les agrega 5 ml de PYG fresco.
  12. Los tubos se llevan a incubar a 30 °C. Los mismos deben estar correctamente sellados con parafilm.

*Protocolo de cultivo axénico de A. castellanii ATCC 30010 utilizando E. coli ATCC 25922 como sustrato*

*Protocolo de cultivo axénico en medio líquido de A. castellanii ATCC 30010*

1. Preparar medio PYG, para lo que se emplean una gama de reactivos en las siguientes cantidades: peptona (3,75 g), extracto de levadura (0,37 g), sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (0,49 g), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (0,0295 g), citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (0,5 g), sulfato de hierro (II) y amonio [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] (0,01 g), fosfato dihidrógeno de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (0,017 g), fosfato de hidrógeno disódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (0,1775 g), glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (7,5 g) y agua destilada (500 ml).
2. Pesar los reactivos en un recipiente en la balanza analítica y en cuanto al agua destilada se debe ajustar en una probeta graduada.
3. Tomar un matraz de 200 ml, agregar la cantidad pesada de cloruro de calcio y disolver en 100 ml de agua destilada.
4. Añadir los reactivos restantes a un matraz de 500 ml en el orden que se ha mencionado previamente y disolver en aproximadamente 300 ml de agua destilada. Finalizado esto se mezcla con la solución de cloruro de calcio.
5. Para que se disuelva de manera más uniforme, llevar a una plancha caliente la solución.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Para la preparación del agar sin nutrientes se emplean una serie de reactivos en las siguientes cantidades: agar-agar (6 g), solución salina amebal estéril de Page (40 ml) y agua destilada (400 ml).
7. Pesar los reactivos en una balanza analítica y en cuanto al agua destilada y la solución salina se debe ajustar en una probeta graduada.
8. Añadir la cantidad pesada de Agar-Agar a la botella de 500 ml y disolver en aproximadamente 300 ml de agua destilada.



9. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, una vez que salga se dispensará el medio en cajas petri y se sellan con parafilm.
10. Ahora, en cuanto al cultivo monoxénico se emplea el cultivo de amebas (centrifugadas) en medio PYG, *E.coli* previamente inactivas y agar no nutritivo.
11. Con una pipeta de 100 l se esparce el contenido de los cultivos en cajas petri con agar no nutritivo. La caja debe contener 75 l de *A. castellanii* y 75 l de *E.coli*.
12. Se deja en la incubadora a 30° C por 4-5 días aproximadamente donde se podrá observar el crecimiento de las amebas.

#### *Protocolo de mantenimiento de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010*

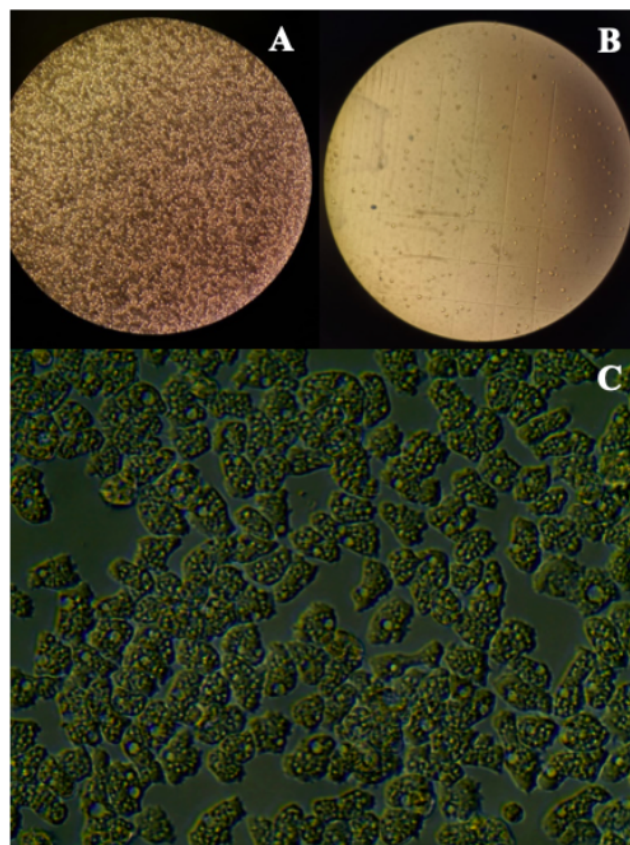
1. Sembrar la cepa amebal en un frasco de cultivo celular (T-75) en medio PYG e incubar a 27 °C hasta que se forme una capa en el fondo del frasco.
2. A partir de estos cultivos se obtendrán muestras para almacenamiento separando las amebas por medio del método de congelación suave.
3. En el método de congelación el medio se reemplaza por 2 ml de medio PYG fresco. El frasco de cultivo celular se lleva a congelar a -20 °C por 10 min (esto permitirá que las amebas se despeguen).
4. Seguido a ello se toman muestras de 1 ml y se ponen en tubos con tapa rosca.
5. Estas muestras se almacenan en el refrigerador a 4 - 8 °C.

#### *Conteo de células de Acanthamoeba inoculadas en medio PYG*

Las células amebales formaron una monocapa de tono transparente en la parte inferior de los frascos de cultivo celular (T-75). Se han observado en un microscopio invertido en lente 10x comprobando que existe una confluencia del 90 - 100 %, además en el lente 40x se determinó que las células estaban en su etapa de trofozoíto lo cual indica la viabilidad y buen estado de las mismas, también se observó la presencia de núcleos prominentes y vacuolas contráctiles. El conteo de células mostró que en promedio existen aproximadamente  $2,8 \times 10^6$  células por mililitro (figura 1).

## DISCUSIÓN

La reproducibilidad de resultados de investigación está ligada a la protocolización de los métodos y técnicas utilizadas, aún más cuando se trata de métodos de cultivo y mantenimiento de microorganismos. A pesar de que varias condiciones de nutrientes, temperaturas y rangos de pH, entre otras, pueden permitir la subsistencia de un organismo, las variables del medio en que proliferan y se mantienen pueden acabar siendo factores que interfieran con los resultados de los experimentos que se lleven a cabo con dicho organismo o que conduzcan a diferentes resultados (Raymond Choo *et*



**Fig. 1:** A: *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 10x; se observa una confluencia del 100 % de las células amebales. B: *A. castellanii* ATCC 30010 en las rejillas de la cámara de Neubauer. C: *A. castellanii* ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 40x.

*al.*, 2006). Es por esta razón, que la estandarización de protocolos de cultivo y mantenimiento de *Acanthamoeba* emerge como una necesidad.

Las amebas del género *Acanthamoeba* son un excelente modelo de organismo hospedador que puede ser utilizado en el laboratorio para el estudio de patógenos a los que alberga y protege: bacterias, hongos y principalmente virus cuyo cultivo es complejo y dependiente de células que les permitan completar su ciclo de vida (Khan, 2006).

La propagación de las amebas del género *Acanthamoeba* en medio axénico es necesaria para el mantenimiento de cultivos puros en el laboratorio y como se muestra en los resultados, el medio PYG resulta ser el más adecuado (Byers, 1979). A pesar de la existencia de este medio preparado en formulación comercial, el requerimiento de cantidades significativas hace que la preparación de este sea más atractiva desde el punto de vista costo-beneficio. Los reactivos son comunes a una gran cantidad de medios de cultivo microbiológico y, por esta razón, son de fácil acceso y disponibilidad en laboratorios de microbiología. Asimismo, el cultivo en medio líquido permite verificar parámetros físicos, como la turbidez, de manera sencilla para determinar posibles contaminaciones además del monitoreo del crecimiento de las amebas (Penland y Wilhelmus, 1997).

Para el cultivo de las amebas en medio PYG, los tubos cónicos de 50 ml resultan especialmente útiles pues permiten la propagación amplia de los microorganismos. No obstante, es importante que se considere la disponibilidad de una cen-

trífuga adecuada para dichos tubos que será necesaria para el lavado y recolección de las amebas previa su refrigeración o trasplante a cultivos monoxénicos. En caso de ser necesario se recomienda utilizar tubos cónicos de 15 ml, el pasaje de las amebas deberá ser más frecuente puesto que existe menos disponibilidad de superficie de adherencia.

Debido a que las amebas son organismos eucariotas que naturalmente se alimentan de bacterias, el cultivo monoxénico, es decir el cultivo en que se utiliza un medio poco nutritivo y el sustrato consiste en una capa de bacterias, es altamente efectivo para el crecimiento y reproducción de estas (Penland y Wilhelmus, 1997). Para el diseño del medio de cultivo, fue importante tener en cuenta que existiera la mínima cantidad de nutrientes. El razonamiento de esta preparación es que las bacterias *E. coli* no deben ser capaces de alimentarse y reproducirse, pues la velocidad de crecimiento de las bacterias es mucho mayor que la velocidad de reproducción de las amebas. De ser el medio en exceso nutritivo, las bacterias competirían por recursos con las amebas y existiría un sobrecrecimiento que resultaría perjudicial para el adecuado mantenimiento de las amebas (Byers, 1979). La formulación del medio que se propone en este trabajo asegura la supervivencia de bacterias y amebas, pero favorece la proliferación de las amebas. Aquí también es relevante que se tenga en cuenta que, por la composición de agar en el medio, las cajas deben mantenerse como máximo 4 - 5 días en la incubadora y que un nivel de condensación que resulte en gotas de agua sobre la superficie se considera normal.

En este mismo tema, la inactivación de las bacterias es un paso crítico, justamente por la velocidad de proliferación de estas (Goldblith y Wang, 1967). Este paso es indispensable para asegurar que las amebas puedan utilizar a las bacterias como alimento. Durante la inactivación se puede utilizar medio PYG, solución salina para amebas o idealmente agua de peptona y se recomienda sellar el tubo con Parafilm para evitar contaminaciones. El tiempo para la inactivación ideal es de dos horas a una temperatura baja (56 grados centígrados), de esta manera, las bacterias no están muertas en su totalidad, sino que están en un estado inactivo que les dificultará la proliferación en la placa y serán presa fácil de las amebas (Goldblith y Wang, 1967).

## CONCLUSIONES

Estos protocolos permiten la viabilidad de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 cultivado en condiciones de laboratorio. Usando cantidades adecuadas tanto de inóculo como de reactivos para realizar los medios de cultivo se logró la propagación de la cepa ATCC 30010.

En los protocolos se establecen los pasos necesarios para la obtención de cultivo de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en medio líquido PYG así como en medio sólido utilizando agar no-nutritivo y *Escherichia coli* ATCC 25922 como su fuente de sustrato, indicando las condiciones ambientales óptimas para su replicación en laboratorio.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a la Dra. Karin Caumo de la Universidad de Santa Catarina, Brasil, por su generosa donación de cepas de *Acanthamoeba cas-*

*tellanii*. Su invaluable contribución enriqueció significativamente nuestros esfuerzos de investigación y desempeñó un papel crucial en el éxito de nuestros estudios.

Además, extendemos nuestro más sincero agradecimiento a la Ingeniera Fernanda Jaramillo por su dedicada participación en la parte práctica de los cultivos.

Estas personas han realizado contribuciones significativas a nuestro proyecto, y estamos verdaderamente agradecidos por su apoyo y colaboración.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización: DRC y JAR; metodología: DRC, ASV, AVT Analisis formal: DAC; investigacion: DRC, ASV, AVT recursos: DRC y JAR; redaccion — preparacion del borrador original: DAC, AVT; redaccion — revision y edicion: DRC; visualizacion: DRC y JAR; supervision: JAR; administracion de proyecto: DRC y JAR; adquisicion de financiamiento para la investigacion: DRC y JAR. Todos los autores han leído y aceptado la version publicada del manuscrito.

## FINANCIAMIENTO

Este estudio se llevo a cabo con financiamiento propio y de la Universidad Nacional de Loja, con el proyecto 18-DI-FARNR-2021 titulado “Identificación física y molecular de un nuevo virus nucleocitoplasmático de ADN de gran tamaño (NCDLVs), presente en cuerpos lacustres de la provincia de Loja, por medio de la infección de cultivo de *Acanthamoeba castellanii*” otorgado por la Dirección de Investigación a Daniela Román-Cáceres y al grupo de investigación de Genética y Biología Molecular de la UNL.

## REFERENCIAS

- Anjum, M. F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T. U., Donner, E., Stehling, E. G., ... Pedersen, K. (2021). The potential of using *e. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (amr) in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 64. doi: 10.1016/j.mib.2021.09.011
- Attariani, H., Turki, H., Shoja, S., Salahi-Moghaddam, A., Ghanbarnejad, A., y Shamseddin, J. (2020). Investigating the frequency of free-living amoeba in water resources with emphasis on acanthamoeba in bandar abbas city, hormozgan province, iran in 2019-2020. *BMC Research Notes*, 13(1). doi: 10.1186/s13104-020-05267-z
- Bowers, B., y Olszewski, T. E. (1983). *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *The Journal of Cell Biology*, 97(2). doi: 10.1083/jcb.97.2.317
- Byers, T. J. (1979). Growth, reproduction, and differentiation in acanthamoeba. *International Review of Cytology*, 61. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62000-8
- Caumo, K. S., Monteiro, K. M., Ott, T. R., Maschio, V. J., Wagner, G., Ferreira, H. B., y Rott, M. B. (2014). Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of acanthamoeba polyphaga. *Acta Tropica*, 140. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.009
- de Souza Gonçalves, D., da Silva Ferreira, M., Liedke, S. C., Gomes, K. X., de Oliveira, G. A., Leão, P. E. L., ... Guimaraes, A. J. (2018). Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa acanthamoeba castellanii under homeostasis and nutritional stress and

- their damaging potential to host cells. *Virulence*, 9(1). doi: 10.1080/21505594.2018.1451184
- Goldblith, S. A., y Wang, D. I. C. (1967). Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology*, 15(6). doi: 10.1128/aem.15.6.1371-1375.1967
- Greub, G., y Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2). doi: 10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
- Khan, N. A. (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 43(6). doi: 10.1007/s002840010325
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4). doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., y Paget, T. A. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 45(3). doi: 10.1007/s00284-001-0108-3
- Landell, M. F., Salton, J., Caumo, K., Broetto, L., y Rott, M. B. (2013). Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in southern Brazil. *Experimental Parasitology*, 134(3). doi: 10.1016/j.exppara.2013.03.028
- Lee, J., y Kaletunç, G. (2010). Inactivation of salmonella enteritidis strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1). doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.010
- Machado, T. B., de Aquino, I. L. M., y Abrahão, J. S. (2022). Isolation of giant viruses of *Acanthamoeba castellanii*. *Current Protocols*, 2(5). doi: 10.1002/cpz1.455
- Penland, R. L., y Wilhelmus, K. R. (1997). Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4). doi: 10.1128/jcm.35.4.915-922.1997
- Raymond Choo, K. K., Boyd, C., y Hitchcock, Y. (2006). The importance of proofs of security for key establishment protocols. formal analysis of Jan-Chen, Yang-Shen-Shieh, Kim-Huh-Hwang-Lee, Lin-Sun-Hwang, and Yeh-Sun protocols. *Computer Communications*, 29(15). doi: 10.1016/j.comcom.2005.10.030
- Siddiqui, R., y Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*, 5(1). doi: 10.1186/1756-3305-5-6
- Visvesvara, G. S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13. doi: 10.1093/clind/13.Supplement\_5.S369
- Weisman, R. A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annual Review of Microbiology*, 30. doi: 10.1146/annurev.mi.30.100176.001201
- Yousuf, F. A., Siddiqui, R., y Khan, N. A. (2013). *Acanthamoeba castellanii* of the t4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasites and Vectors*, 6(1). doi: 10.1186/1756-3305-6-169
- Świdorski, Z. (2009). *Acanthamoeba*. biology and pathogenesis. *Acta Parasitologica*, 54(3). doi: 10.2478/s11686-009-0036-0