

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



**FUNDAMENTOS Y TECNICAS PARA LA PRESERVACION
DE BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS**

Bogotá, Mayo de 2016

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION

1. Historia y Evolución de las Técnicas de Preservación

2. Colección de Cultivos

2.1 Historia

2.2 Importancia

2.3 Funciones

2.3.1 Propósito de la Colección

2.3.2 Preservación

2.3.3 Distribución

2.3.4 Identificación

2.3.5 Publicaciones

2.4 Tipos de Colecciones

2.4.1 Especializadas

2.4.2 Referencia

2.4.3 Nacionales

2.5 Principales Colecciones del Mundo

2.6 Formato Modelo del IBUN

3. Parámetros para la Selección de Métodos de Preservación

4. Métodos de preservación

4.1 *Métodos a Corto Plazo*

4.1.1. Subcultivo

4.1.2. Congelación Ordinaria

4.1.3. Baja Congelación -70°C

4.1.5 Secado

4.1.5.1 Suelo, Arena

4.1.5.2 Tiras ó Discos de Papel Filtro

4.1.5.3 Tapones Presecados

4.1.5.4 Discos de Gelatina

4.1.5.5 Silica Gel

4.1.5.6 Perlas de Vidrio ó Porcelana Porosas

4.2 *Métodos a Largo Plazo*

4.2.1 Liofilización

4.2.1.1 Equipos

4.2.1.2 Etapas del proceso de Liofilización

4.2.1.3 Efectos de la Liofilización

4.2.2 Almacenamiento en Nitrógeno Líquido

4.2.2.1 Naturaleza del Criodañó

4.2.2.2 Agentes Crioprotectores

5. Parámetros para la Evaluación de los Métodos de Preservación

5.1 Características de los cultivos a ser evaluadas

INTRODUCCION

A pesar de que la preservación* de cultivos**, frecuentemente utilizados en el laboratorio, son actividades consideradas de poca prioridad, el incremento de la producción de antibióticos como la penicilina (*Penicillium chrysogenum*), cefalosporinas (*Cephalosporium acremonium*), Amphotericina B, Kanamicina (*Streptomyces*), enzimas como las amilasas (*Aspergillus oryzae*), proteasas (*Bacillus*), vitaminas como la Riboflavina (*Eremothecium ashbyi*), Vitamina B12 (*Pseudomonas denitrificans*), Aminoácidos como L-Lysina (*Corynebacterium glutamicum*), la utilización de (*Sacharomyces cerevisiae*) en la industria panadera, (*Sacharomyces carlsbergensis*) en la industria cervecera, (*Aspergillus niger*) en la producción de ácido cítrico y (*Bacillus thuringiensis*) en la producción de bioinsecticidas (H.J.Phaff 1981), han venido estimulando la necesidad de seleccionar métodos que proporcionen la mayor estabilidad en las características de interés ó valor a nivel investigativo ó industrial.

Es necesario resaltar que no existe un método único para la preservación de todos los cultivos, por que los diversos grupos taxonómicos y aún especies dentro de un mismo género exhiben, diferentes respuestas, por otra parte se ha publicado pérdida de las características por las cuales fueron preservados los cultivos a pesar de mantener la viabilidad como por ejemplo; la capacidad de producir toxina Tipo E por *Clostridium botulinum* (Shannon et al 1975) y los antígenos somáticos en *Salmonella* (Dietz 1975) . De ahí la necesidad de conservar los cultivos por más de un método de preservación y seleccionar los métodos que proporcionen la mayor estabilidad de las características de interés, a un costo razonable.

Este libro, describe el fundamento y las técnicas más utilizadas para la preservación de bacterias , hongos y levaduras por períodos cortos y prolongados de tiempo, también describe los parámetros a tener en cuenta en la elección del método de preservación, en la evaluación del método y en el monitoreo de los cultivos, por otra parte menciona la importancia y funciones de las colecciones de cultivos y las direcciones de las principales colecciones mundiales donde se pueden almacenar cultivos a ser patentables y adquirir cultivos que en su gran mayoría reflejan el esfuerzo de cientos de científicos quienes han aislado un único microorganismo en el mundo, para ser utilizado en la investigación ó industria.

* Mantenimiento de un organismo en condiciones metabólicas que reprimen el crecimiento

** Tubo ó frasco que contiene medio con el crecimiento de un organismo.

1. HISTORIA Y EVOLUCION DE LAS TECNICAS DE PRESERVACION

La fermentación con la utilización de “semillas” como inóculos para la producción de bebidas alcohólicas fueron utilizadas por los egipcios (2000-3000 A.C), esta actividad implicaba la necesidad de conservar las semillas de generación en generación. (Stevenson, R and Hatt, H 1992)

Las bases de la Bacteriología, logradas a finales del siglo XIX, establecieron la necesidad de coleccionar, preservar y comparar cultivos obtenidos de diferentes fuentes. Sin embargo desde 1930, las técnicas de preservación de material biológico, han sido de interés científico.

La preservación inicial de los microorganismos, se realizaba en caldo nutritivo y en extracto de malta, con la utilización de medio sólido con agar ó gelatina, estos se incubaban a temperatura ambiente, y de ahí se realizaban transferencias periódicas a intervalos apropiados, con el riesgo de pérdida y cambio en las características, esto estimuló la implementación y desarrollo de técnicas de preservación orientadas hacia la disminución de la actividad metabólica y crecimiento celular, favoreciendo la estabilidad de las características de interés industrial ó investigativo por las que fueron preservadas con una reducción en los costos y labores.

El primer dato de preservación de cultivos por periodos prolongados, fué con especies de levaduras, las cuales fueron suspendidas en una solución de sucrosa al 10%, con lo que se logro una supervivencia de 8 años, sin embargo su actividad fisiológica fué significativamente baja y no se recuperó aún después de repetidos subcultivos en medio fresco (Will, 1909).

Shackell (1909), estudió métodos de vacío-secado aplicables al virus de la rabia en estado de congelación, también introdujo la utilización de suero y leche en el proceso de liofilización.

Hammer (1911), introduce el primer método de congelación para el almacenamiento de especies de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Lumiere and Cherrotier (1914), desarrolla un método para el almacenamiento de *Neisseria gonorrhoeae*, en un medio de cultivo que contenía suero, cubierto con parafina líquida.

Rogers (1914) reporta la utilización de leche descremada, como favorable para la preservación de bacterias ácido lácticas por liofilización.

Heller (1941) reporta que la adición de componentes metabólicos cristaloides de alta solubilidad (sucrosa y glucosa), incrementan el efecto protector de coloides hidrofílicos y reduce significativamente el daño celular.

Fry and Greaves (1951), demuestra un incremento en supervivencia celular después de la adición de 5 - 10% de glucosa al suero bovino.

Muchas sustancias han sido utilizadas como agentes crioprotectores que reducen el daño celular durante la congelación-descongelación, entre los más utilizados

tenemos: Glicerol (Polge et al., 1949), ácido glutámico (Miller and Goodner, 1953), dimetil sulfóxido (lovelock and Bishop, 1959), glucosa, sacarosa y lactosa. Estos aditivos son sustancias que controlan eficientemente la velocidad de congelación de las células y adicionalmente son permeables a la membrana celular, razón por la cual su efecto protector se incrementa.

El término "L-secado", fue utilizado por Annear (1958), este método permite reducir significativamente el tiempo de secado, economizar y disminuir labores, en especial cuando se trabajo con un número significativo de muestras simultáneamente. Este método fue investigado y puesto en práctica por Iijima and Sakane (1970) y ampliamente utilizado para la conservación de bacterias, hongos, levaduras, actinomycetes y bacteriófagos.

Hamada (1982) cubrió la superficie del cultivo de actinomycetos con parafina y congeló a -20°C .

2. COLECCIONES DE CULTIVOS

2.1 Historia

En 1890 Frantisek Král establece la primera colección mundial de bacterias y hongos en Praga, y realiza la primera publicación sobre colección de cultivos, en 1902, sin embargo en 1911 la colección fue cerrada. (Kocur 1990).

Después de la muerte de Král, E. Pribam transfiere la colección de cientos de cultivos a la Universidad de Viena en 1914. Él también publicó un catálogo en 1919. En 1930 cuando Pribam se une a la facultad de Loyola University School of Medicine en Chicago él compró la mitad de la colección, la otra mitad fue destruida durante la segunda guerra mundial. Cuando Pribam murió, algunos de los cultivos fueron transferidos a la ATCC.

En 1899 con el inicio de The American Bacteriological Society, se propuso el establecimiento de una colección de bacterias para uso público. Esta fue organizada en The National History Museum de Nueva York en 1911. Otras colecciones fueron establecidas, con el fin de soportar la investigación en ciertas áreas como: salud humana, agricultura y veterinaria, ó para dar soporte a ciertas disciplinas como botánica, micología y microbiología, como el caso de The Centraalbureau voor Schimmelcultures, colección que fue fundada en Netherlands en 1904 por The International Association of Botanists. The National Collection of Type Cultures * fue establecida en 1920 y en 1960 The Fungal Genetics Stock Center fue fundada por Dartmouth College.

En 1925 se origina la ATCC (American Type Culture Collection), una de las colecciones más grandes del mundo actualmente, en 1981 la ATCC fue autorizada como el primer depósito internacional para cultivos a ser patentables, por los tratados Internacionales de Budapest. (Stevens, R. and Hatt, H 1992).

2.2 Importancia de las Colecciones de Cultivos

La creación de colecciones de cultivos, y el desarrollo de técnicas de preservación, han ido incrementando en los últimos años, por los avances que se han alcanzado en investigación biológica, con énfasis en biotecnología. La validación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos de investigación se ha logrado, por la disponibilidad de cultivos a partir de las colecciones, lo cual establece un punto común entre los diferentes grupos.

* **Cepa** que sirve como base para describir el nombre de la especie ó subespecie.

Los principales argumentos para constituir una colección de cultivos son: (Hunter et al., 1986)

- Conveniencia logística al centralizar la colección de cultivos
- Seguridad del mantenimiento de stock de cultivos, sin riesgo de pérdida por errores en la manipulación y almacenamiento
- Garantizar la seguridad de todas las personas que adquieren material biológico, por la información del riesgo potencial ambiental y a la salud que este representa.
- Asegurar la consistencia en manipulación y preservación de los cultivos en una colección particular.
- Incrementar la habilidad de localizar cultivos a cualquier momento.

2.3 Funciones de las Colecciones

En 1990 The World federation for Culture Collections (WFCC) publicó “Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms”, el cual proporciona la información de los principios de organización y operación de una colección y sugiere requerimientos mínimos en recursos y manejos. Todas las colecciones representan una alta inversión de tiempo y dinero, por lo tanto el establecimiento y mantenimiento de una colección de cultivos, no debe ser algo trivial y por el contrario debe representar un adecuado planteamiento y estimación real de los recursos requeridos. Las principales funciones de las colecciones de cultivos son: (Stevenson, R and Hatt, H 1992)

2.3.1 Propósito de la Colección.

La colección de material biológico depende del interés por el cual, esta va a ser utilizada, por lo tanto las colecciones deben ser creadas con base en la selección ordenada de criterios reconocidos ó de significancia científica.

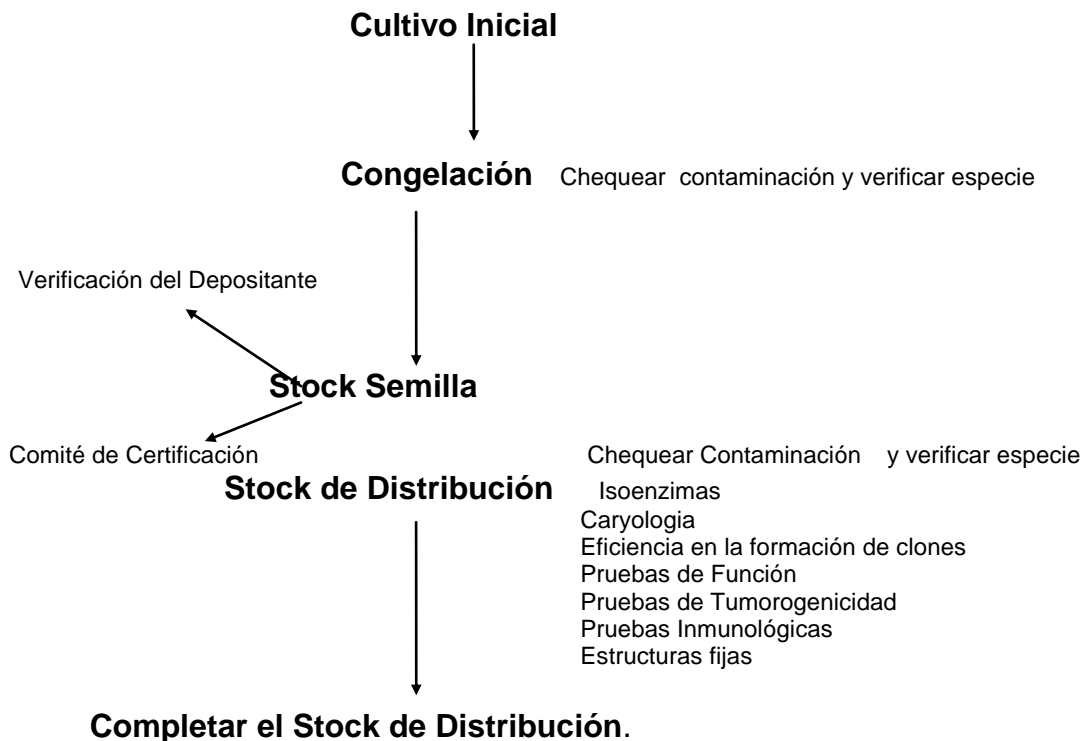
Es importante que toda colección establezca un sistema de registro de datos, con relación a la historia, información de la fuente de aislamiento, publicaciones, condiciones de almacenamiento y manipulación.

2.3.2 Preservación

El corto tiempo de generación de muchos microorganismos y la posibilidad de cambios genéticos, con lleva al concepto de “stock semilla como una estrategia para el manejo de la colección de cultivos. Para ello un cultivo bien caracterizado es dividido en varias alícuotas, este material es utilizado como semilla para el stock de distribución, de tal forma que la colección puede proveer a los científicos de cultivos comparables por más de 50 años. En la Figura 1 se observa un esquema utilizado por la ATCC, en el concepto de semillas stock. La

metodología es la siguiente: A partir de un cultivo inicial, se prepara una muestra congelada, se chequea la contaminación y se verifica la especie. A partir de la muestra congelada, son preparados y caracterizados la semilla stock y el stock de distribución. Muestras de la semilla stock son retornadas, a la persona que la depositó para su verificación, simultáneamente se envía muestras del stock semilla a un comité de certificación. Cuando nuevos stock de distribución son necesarios, el stock de semilla altamente caracterizado es utilizado.

Figura 1. Esquema Utilizado por la ATCC, en el Desarrollo de Semillas Stock.



2.3.3 Distribución

El envío de cepas patógenas ó recombinantes, son reguladas en los Estados Unidos por The U.S Department of Agriculture, The U.S. Public Health Service, The U.S. Environmental Protection Agency, and The U.S. Department of Transportation. Estas agencias tienen dos intereses: Determinar si los organismos pueden ser introducidos en áreas nuevas y asegurar un empaque apropiado durante el envío. Adicionalmente, The Postal Service, International Civil Aviation Organization, and The International Air Transport Association tienen regulaciones con relación a la seguridad del contenido durante el transporte. (Kurtzman , C.P 1992).

Las colecciones de cultivos tienen una gran responsabilidad, cuando realizan la distribución de los cultivos, esto debe efectuarse razonablemente, de tal forma

que los recipientes cumplan con los requisitos y recomendaciones, que aseguren la ausencia de riesgo para la salud, con la manipulación y el uso de agentes infecciosos. En la Tabla 1, se clasifican los microorganismos con relación al tipo de riesgo y recomendaciones en cuanto al envío.

Tabla I. **Clasificación de Los Microorganismos en Relación al Riesgo Biológico y los Requerimientos de Envío.** Tomado de Kurtzman , C.P 1992.

Clase I: Agentes de no Reconocido Riesgo Bajo Ordinarias Condiciones.

Ejemplo : *Sacharomyces cerevisiae*, *Thichoderma reesei*, *Lactobacillus casei*
Envío: Tubo del cultivo en un recipiente acrílico u otro tipo de empaque. Permiso es requerido.

Clase II: Agentes de Riesgo Potencial Ordinario

Ejemplo: *Aspergillus fumigatus*, *Candida Albicans*, *Cryptococcus neoformans*,
Staphylococcus aureus
Envío: Tubo de cultivo envuelto en material absorbente, colocado en un envase metálico de tapa rosca. Permiso es requerido

Clase III: Patógenos Involucrados en Riesgos Especiales

Ejemplos: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Bacillus anthracis*,
Yersinia pestis
Envío: Tubo de cultivo plástico, sellado al calor, envuelto en material absorbente, colocado en un recipiente herméticamente sellado, a su vez colocado en una caja de cartón fuerte. Permiso es requerido. Necesaria una etiqueta de Agente Etiológico.

Clase IV: Patógenos de Riesgo Extremo

Ejemplos: *Arthoderma simii*, *Pesteurella multocida*, y ciertos virus de animales y plantas
Envío: Tubo de cultivo en plástico sellado al calor, envuelto en material absorbente, colocado en una lata herméticamente sellada, colocado a su vez en una caja de cartón fuerte. Requiere Permiso. Es necesario la etiqueta de Agente Etiológico.

(U.S. Department of Health, education and Welfare, 1972; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1983)

El envío de agentes etiológicos, debe estar controlado por Instituciones Nacionales e Internacionales. Cuando se va enviar una cepa a ser patentable desde Colombia, es necesario una certificación del DAS (Departamento Administrativo de Seguridad). En el caso de Instituciones internacionales el Departamento de Comercio de los E.U, proporciona las licencias para prescribir formas de empaque y rotulación, conforme a las normas del departamento postal y de transporte. Las colecciones de cultivos deben cumplir con todas estas reglas y obtener los permisos necesarios. En Canadá y Francia, es prohibido el envío de agentes infecciosos por servicio postal.

2.3.4 Identificación

Las colecciones de cultivos, deben tener la capacidad de identificar organismos, esto implica caracterización morfológica, bioquímica, molecular, inmunológica y cuando sea necesario pruebas de patogenicidad.

La identificación se debe basar en los códigos de una nomenclatura específica que valide y legitime la publicación de los nuevos nombres. The Council of Biology Editors Style Manual, proporciona los parámetros autorizadas para citación de organismos. Si se trata de un nuevo aislado, se debe tener la precaución de crear un depósito de este, que asegure su disponibilidad por lo menos durante cinco años para la validación de los trabajos publicados.

2.3.5 Publicaciones (catálogos)

Los catálogos deben consistir en una lista de los nombres de los cultivos que están preservados, también incluye información: fecha, lugar y detalles del origen del material, bibliografía básica de citación y una historia de posesión y procedencia del cultivo.

Otros catálogos incluyen la lista de los cultivos organizadas en relación a sus aplicaciones, propiedades similares tales como: termofilicos, enzimas de restricción etc.

The World Data Center for Microorganisms, publica una combinación de catálogos y directorios donde se encuentra una lista de los microorganismos y líneas celulares que son preservadas y las colecciones donde están disponibles. (Stevenson, R and Hatt, H 1992)

En 1949 The United States Patent and Trademark Office , estipuló que los cultivos a ser patentables ,deben ser depositados en conjunto con las aplicaciones de la patente, concerniente a la invención microbiológica. Las leyes en los E.U, con relación a los cultivos a ser patentables, establecen que estos deben ser almacenados en una colección, por lo menos el tiempo de vida de la patente 17 años, lo cual provee de un depósito neutral, seguridad en el mantenimiento y distribución de cultivos involucrados en los procesos de patentes y evita ilícitas experimentaciones. (Kurtzman , C.P 1992).

2.4 Tipos de Colecciones de Cultivos

En general se consideran tres tipos de colecciones de cultivos: (Gherna, R 1994)

2.4.1 Colecciones Especializadas: Son colecciones altamente especializadas, que mantienen una extensa variedad de especies de una misma **especie**, esta colección es utilizada como soporte para estudios taxonómicos y genéticos. Como ejemplo tenemos:

Bacterial Plant Pathogen Collection of the Late Mortimer Starr at the University of California at Davis.

2.4.2 Colecciones de Referencia: Son colecciones que involucran la colaboración de científicos, industria, academia y gobierno. Como ejemplo tenemos:

The Bacillus Genetic Stock Center
Department of Microbiology
The Ohio State University
484 W. 12th Avenue, Columbus, OH 43210

The Escherichia coli K-12 Stock Culture Collection
Department of Biology, Yale University
255 omi, P.O.Box 666, New Haven, Ct 06511-7444

Collection of Microorganisms
National Center for Agricultural Utilization Research
1815N. University St., Peoria, Il61604-3999

2.4.3 Colecciones Nacionales: Son colecciones que tienen como función: adquirir, identificar, preservar y distribuir cultivos de type y de referencia. Estas colecciones en general ofrecen una amplia variedad de especies , pero poca variedad en cuanto el numero de especies de una especie. También son utilizadas como depósitos nacionales e internacionales, de cultivos a ser patentables. También ofrecen entrenamientos, identificación de cultivos celulares y una fuente de información de cada cultivo, incluye historia, datos de las cepas y aplicaciones especiales.

2. 5 PRINCIPALES COLECCIONES DEL MUNDO

Los catálogos y direcciones de las colecciones de cultivos, son encontradas en The Microbial Strain Data Network y en The World Data Center on Microorganisms, localizada en The Riken Instituto (Wako, Japón) .

Algunas Colecciones Internacionales son descritas a continuación:

- American Type Culture Collection (ATCC)
12301 Prarklawn Drive
Rockville, Maryland 20852-1776
USA
- Japan Collection of Microorganisms (JCM)
RIKEN
Wako
Saitama 351-01
JAPAN
- National Collection of Type Cultures (NCTC)
PHLS Central Public Health
Laboratory
61 Colindale Avenue
LONDON NW9 5HT
- Deutsche Sammlung Von mikroorganismen and Zellkulturen (DSMZ)
GmbH Mascheroder Weg 1b
D-3300 Braunschweig
FRG Germany
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Valencia
E-46100 BURJASOT
España
- Culture Collection of the Base de Datos Tropical
Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “Andree Tosello”
Rua Latina Coelho, 1301
Caixa Postal 1889
Campinas
Sao Paulo
BRAZIL

2.6 Formato Modelo del IBUN para el Registro de los Cultivos

Es importante que cada colección establezca un código de identificación, para un adecuado manejo de la información, por otra parte se debe tener un registro de la historia de los cultivos desde el momento de su ingreso.

La Codificación de los cultivos pertenecientes al IBUN, se ha realizado teniendo en cuenta la clasificación establecida en el Manual Bergey, por ejemplo para una cepa de *Escherichia coli*, el código sería el siguiente:

Grupo:	5	Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos
Familia:	1	Enterobacteriaceae
Género:	1	Escherichia
Especie:	1	coli.
Consecutivo interno	1	

El formato establecido para el registro y control de cada cepa es el siguiente:



BANCO DE GENES Y CEPAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACIÓN:

Código

Familia: _____ **Género:** _____ **Especie:** _____

LOCALIZACION:

Liofilizado: _____

Congelación -70°C: _____

Congelación -20°C: _____

Subcultivo 4°C: _____

Silica: _____

Papel de Filtro: _____

Suelo: _____

Otros: _____

ORIGEN:

Aislada por: _____ Lugar: _____

Traída por: _____ Fecha de Ingreso: _____

Conservada por: _____

CARACTERISTICAS:

Macroscópicas:

Microscópicas:

Bioquímicas:

Fisiológicas:

Genéticas:

CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO:

Atmósfera: _____ Temperatura: _____ pH: _____

Medios de Cultivo: _____

Incubación: _____

Resistencia a Antibióticos: (concentración) _____

VIABILIDAD:

Localización	Fecha de Conservación	Fecha de Evaluación	Resultado de Viabilidad	Resultado Estabilidad de las Características	Observaciones

3. PARAMETROS PARA LA SELECCIÓN DE LOS METODOS DE PRESERVACION

Existe una gran variedad de métodos que tienen ventajas y desventajas, disponibles para la conservación de microorganismos, sin embargo hay que seleccionar el método que permita la mayor estabilidad en la característica de interés investigativo ó industrial por la cual se va a conservar la cepa. Si se tiene en cuenta que la reata de supervivencia y el mantenimiento de su actividad no siempre se relacionan (Maruyama, 1982). La función básica de la conservación es mantener la viabilidad, no contaminación y estabilidad de las características de manera la cepa conservada sea lo más posible igual a la original. No todas las cepas responden de igual forma al mismo método, incluso algunas especies son variables al mismo proceso. Es importante enfatizar que el éxito o el fracaso de cualquier método, depende de la utilización de un medio adecuado, procedimiento utilizado en la cultivación y edad del cultivo, esto es particularmente importante cuando trabajamos con bacterias que contienen plasmidos de resistencia o DNA recombinante, ó que exhiben fases de crecimiento como los esporoformadores. Los siguientes parámetros son las consideraciones que deben ser tenidas en cuenta en la selección de un método de conservación.

- 1. Mantenimiento de la Viabilidad:** La muerte celular, puede ocurrir durante el proceso de conservación y almacenamiento, es por ello que se debe seleccionarse un método que disminuya el riesgo de pérdida de la viabilidad por periodos prolongados de tiempo.
- 2. Selección por Cambios en la Población:** La reducción en el número de células viables, puede ocasionar la selección de la población, lo cual puede introducir posibilidad de cambio a la cepa originalmente conservada. Por lo tanto se debe seleccionar el método de conservación que favorezca el mantenimiento del mayor número de células viables, de manera que la población sea lo más cercana a la originalmente conservada.
- 3. Cambios Genéticos:** Es importante que el microorganismo conserve las características de interés científico ó industrial, por las cuales fueron conservadas, es por ello que el método de conservación utilizado, no debe favorecer ni la pérdida ni ganancia de otras características.
- 4. Pureza:** Los cultivos conservados deben permanecer puros y el método utilizado debe disminuir la posibilidad de contaminación.
- 5. Costo:** El costo de mantenimiento de los cultivos incluye personal, equipos, reactivos y materiales.
- 6. Réplicas:** Para la consideración de este parámetro es necesario tener en cuenta: número de operarios que se requieren para la conservación, evaluaciones periódicas a realizar y el espacio disponible.
- 7. Importancia del Cultivo:** Es importante selecciona el método que me permita disminuir los riesgos de pérdida, por lo tanto es necesario la selección de más de un método de conservación. Para cepas de menor valor, criterios como costo deben ser tenidos.

- 8. Suministro y Transporte del Cultivo:** Si las cepas son suministradas debe existir réplicas de estas, estas réplicas pueden ser preparadas cuando son requeridas, esto depende del método de conservación y del número de cultivos a ser distribuidos. Es importante que el método seleccionado para el suministro debe resistir las condiciones de envío, por otra parte se debe tener en cuenta las regulaciones existentes en cuanto al envío de las cepas.
- 9. Frecuencia en la Utilización del Cultivo:** Los cultivos requeridos con frecuencia, como en el caso de ensayos de control de calidad, deben tenerse en cuenta el riesgo de contaminación y la necesidad de recuperación cada vez que sea necesario.

4. METODOS DE PRESERVACION

Los métodos de preservación se dividen en métodos de corto y largo plazo:

MÉTODOS DE CORTO PLAZO:

1. Subcultivo
2. Inmersión en Aceite
3. Congelación Ordinaria -20°C
4. Baja Congelación -70°C
5. Secado
 - Suelo O Arena
 - Papel De Filtro
 - Tapones Presecados
 - Gelatina
 - Silica Gel
 - Perlas De Vidrio Y Porcelana

METODOS A LARGO PLAZO

1. LIOFILIZACION
2. ULTRACONGELACION

En las Tablas se describe la comparación de los diferentes métodos utilizados para la preservación de microorganismos y la efectividad de los mismos.

Tabla Comparación de los Métodos de Preservación

<i>Método de Preservación</i>	<i>Costo</i>	<i>Longevidad</i>	<i>Estabilidad</i>
-------------------------------	--------------	-------------------	--------------------

				Genética
	Material	Labor		
Transferencia Periódica				
Almacenamiento a temperatura ambiente	Baja	Alto	1-6 meses	Variable
Almacenamiento en el refrigerador	Media	Alto	6 -12 meses	variable
Almacenamiento en aceite	Baja	Bajo/Medio	1 -40 años	Pobre
Almacenamiento en agua	Baja	Bajo/Medio	1- 5 años	Moderada
Almacenamiento en congelación	Media	Bajo/Medio	4 - 5 años	Moderada
Secado				
Suelo	Baja	Medio	5 - 25 años	Moderada a baja
Silica gel	Baja	medio	5 - 19 años	Buena
Liofilización	Alta	Inicialmente	4 - 40 años	Buena
				Media
Congelación				
Nitrógeno Líquido	Alto	Baja	Infinita	Buena: 23 años

Tabla de Comparación de géneros bacterianos conservados por diferentes métodos

Géneros	Subcultivo (meses)	Inmersión en aceite (años)	Baja congelación (años)	Liofilización (años)	Ultracongelacion. Nitrógeno liquido (años)
Acetobacter	1-2	1	1-3	>40	>40
Achromobacter	1	1-2	1-3	>40	>40
Acinetobacter	1 semana			>40	>40
Actinobacillus	1 semana	2-3		>40	>40
Actinomyces	1		2-3	>40	>40
Agrobacterium	1-2	1-2		>40	>40
Arthrobacter	1-2		1-2	>40	>40
Bacillus	2 -12	1	2-3	>40	>40
Bacteroides	1 semana		1	>40	>40
Bifidobacterium	1 semana			>40	>40
Chromatium	1			>5	>40
Clostridium	6-12	1-2	2-3	>40	>40
Corynebacterium	1-2	1	1-2	>40	>40
Enterobacter	1-4	1-2		>40	>40
Erwinia	1-4	1-2		>40	>40
Escherichia	1-4	1-2		>40	>40
Flavobacterium	1	2		>40	>40
Gluconobacter	1			>40	>40
Haemophilus	1 semana	1 mes (37°C)		>40	>40
Klebsiella	1-4	1	1-2	>40	>40
Lactobacillus	1 semana			>40	>40
Methanobacterium	1			>5	>40
Methanomonas	1			>5	>40
Micromonospora	1		1	>40	>40
Neisseria	1			>40	>40
Nocardia	1 - 4	1	1-2	>30	>40
Proteus	1 - 2	1	1-2	>40	>40
Pseudomonas	1 -3			>40	>40
Spirillum	1 semana			>40	>40
Staphylococcus	1 - 2		1	>40	>40
Streptococcus	1-2	1		>40	>40
Streptomyces	1-8	1-2	1-3	>40	>40
Xanthomonas			1-2	>40	>40

Esta lista son aproximaciones y existe variación entre las especies de un mismo género

4.1 MÉTODOS A CORTO PLAZO:

4.1.1. Subcultivo: Consiste en la inoculación del cultivo en un medio adecuado, para el crecimiento y almacenamiento en condiciones favorables. El intervalo de transferencia depende del tipo de microorganismo, medio utilizado y condiciones de almacenamiento. El cultivo se replica cada vez a un medio fresco, antes de que el cultivo expire. El tiempo necesario para el repique depende del tipo de microorganismo. En el caso de *Neisseria* sp se requiere un subcultivo antes de unas pocas semanas.

Se recomienda tener dos tubos, un tubo es mantenido como stock y a partir del otro se realizan los subcultivos que se demanden.

Puede suceder deshidratación del medio, esto depende del sellado y de la tapa que se utilice.

El medio utilizado puede afectar la supervivencia de la cepa, por lo tanto se recomienda la utilización de medios no enriquecidos con limitaciones en nutrientes para disminuir el metabolismo. No se debe utilizar un medio en que haya exceso de carbohidratos, por que la producción de ácidos puede afectar la viabilidad de la cepa. Sin embargo es necesario tener en cuenta que algunas cepas requieren de medios complejos necesarios para sus necesidades fisiológicas, esto aumenta el número de transferencias del cultivo como resultado del crecimiento. El almacenamiento en agua ha sido recomendado para algunos microorganismos (Berger 1970).

También se prolonga el tiempo de almacenamiento si se evita la deshidratación del medio, mediante utilización de tubos tapa rosca, la cual ha su vez se envuelve en parafilm ó se colocan los tubos en una bolsa plástica en el refrigerador (5-8°C). Con estas precauciones las bacterias pueden ser mantenidas entre 3 a 5 meses .

La actividad metabólica puede disminuirse también mediante el almacenamiento a baja temperatura, el almacenamiento a 4°C ha sido ampliamente utilizado, sin embargo en el caso de *Neisseria* sp, es mejor el almacenamiento a 37°C.

Los intervalos de transferencia deben ser mínimos para evitar la selección de la población, mantener duplicados es una precaución contra el riesgo de pérdida. Los cultivos se evalúan después de cada transferencia la pureza, viabilidad y estabilidad, se recomienda no seleccionar colonias aisladas , para la transferencia por que el riesgo de selección de una mutante es mayor.

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Poco costo en términos de equipo	Costo en cuanto al personal necesario para realizar los subcultivos
Fácilmente recuperables, cuando son cultivos que se requieren con alta frecuencia	Alto riesgo de contaminación por subcultivo
Aplicable a un amplio rango de microorganismos	Alto riesgo de mutación Alto riesgo de selección en la población y pérdida de características Se requiere de un espacio amplio para el almacenamiento. No es un método recomendable para el suministro, por que las condiciones de envío pueden resultar adversas.

Inmersión en Aceite: Algunas bacterias pueden sobrevivir meses e incluso años inmersas en aceite mineral estéril grado medicinal o con la utilización de parafina de gravedad específica 0.865 - 0.890. El aceite se esteriliza en calor seco a 180°C x 2horas, la autoclavación no es recomendable, luego se debe chequear la esterilidad del aceite en un caldo nutritivo.

Para llevar a cabo esta metodología, la bacteria se crece en tubo sobre la superficie del agar, hasta alcanzar la fase logarítmica ó de esporulación, se cubre con el aceite en condiciones de asepsia, dejando una capa de 2 cm, para prevenir la deshidratación y reducir la actividad metabólica y el crecimiento del cultivo. Luego se colocan en le refrigerador verticalmente.

El tiempo de almacenamiento puede prolongarse mediante la disminución del metabolismo microbiano, esto se logra con restricción en la disposición de aire al cultivo (parafina líquida) sobre la superficie del agar, técnica ha sido ampliamente utilizada para la conservación de hongos (Onions 1971).

La viabilidad y estabilidad se evalúan periódicamente, mediante la remoción de una asada de crecimiento, la cual se pone en contacto con una tira de papel filtro para remover el aceite. La viabilidad se evalúa como crecimiento abundante ó escaso. Las desventajas de este método son iguales a las del subcultivo, sin embargo se logra una conservación por mayor tiempo.

4.1.3 Congelación ordinaria: el rango de temperatura es de 0 a -20°C, el éxito depende de la especie bacteriana, algunas bacterias pueden sobrevivir por 6 meses a 2 años. En general no es muy recomendable por el daño que produce a nivel de congelación de la célula.

Cuando la temperatura de la suspensión celular cae más abajo de los 0°C, el liquido extracelular empieza a congelarse y formar cristales de hielo externo, estos aumentan la concentración de soluto y el agua intracelular empieza a migrar hacia fuera de la célula por la diferencia de presión osmótica, esta remoción de agua resulta en un daño celular. Finalmente todo el agua se cristaliza como hielo puro,

dejando solo la concentración de soluto y su agua de hidratación. Cuando el soluto el soluto concentrado se congela estos se denomina temperatura eutética. En la congelación, el agua no es disponible para las células y éstas se deshidratan a bajas temperaturas. Daños celular pueden ocurrir durante la congelación-descongelación, esto se debe a la concentración de electrolitos que son removidos del agua como hielo y a la formación de cristales de hielo, los cuales pueden causar daño a la integridad de la membrana. El daño también puede relacionarse con la velocidad de congelación-descongelación y el tipo de agente crioprotector utilizado. Una rápida descongelación a menos de 0°C, frecuentemente resulta en la formación de cristales de hielo interno, lo cual daña la célula. Un balance entre el daño causado por la concentración de soluto y la formación de hielo interno es logrado por el control de la rata de congelación, una velocidad de 1 a 10°C x minuto, es satisfactoria para todas las bacterias. La concentración de solutos, durante la congelación puede alterar los componentes del medio por la formación de complejos ó bajas de pH, que empobrecen la capacidad buffer del medio. La temperatura eutéctica de una solución puede variar dependiendo la composición, una solución de NaCL tiene una temperatura eutectica de -21.8°C.

todos estos efectos puede disminuirse mediante la adición de agentes crioprotectores tales como el glicerol y el dimetil sulfoxido.

Las temperaturas de congelación de cultivos como método de conservación que han sido reportadas son: -20°C, -30°C, -40°C, -70°C, -146°C y -196°C. En general se ha observado que la congelación a -30°C, da pobres resultados debido a eutectica mixtures ??, expone a la célula a altas concentraciones de sal.

4. 1.4. Baja Congelación:

El almacenamiento a -70°C, ha sido ampliamente utilizado para una variedad de microorganismos que incluyen; bacterias, hongos, micoplasmas, protozoos y virus. Para la realización de esta metodología, se prepara una suspensión celular en un caldo con glicerol (30 -50%v/v).

las células se recuperan por descongelación en un baño a 37°C. También se ha utilizado perlas de vidrio con una concentración de glicerol 25%v/V. Se colocan 30 perlas en viales de 2mL y se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos a 121°C. Es necesario marcar los viales con tinta que no se desvanezca por la baja temperatura. La suspensión celular se prepara a una concentración de 1×10^8 células, se agrega el glicerol(15%) y se dispensa en cada vial 0.5mL. Agitar para impregnar todas las perlas y eliminar el exceso con pipeta de pasteur. Se recuperan las células removiendo asépticamente cada perla sin dejar descongelar todo el vial, para ello se retira del congelador a -70°C y se coloca el vial sobre hielo picado.

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Utilizado para una amplia variedad de bacterias Metodología rápida y fácil, no requiere subsecuente manipulación, durante el almacenamiento Espacio mínimo Utilizado para la preservación de microorganismos por periodos prolongados de tiempo	Costo de equipo No es utilizado cuando las muestras se requieren con mucha frecuencia

4.1.5 Secado: Los métodos de desecado consisten básicamente, en la remoción de agua y prevenir la rehidratación. Este método es ampliamente utilizado para la conservación de hongos.

4.1.5.1 Suelo, Arena:

Varias especies de hongos esporulados sobreviven por períodos superiores a cinco años, sin pérdida en las características (Altkinson 1954). Las esporas son más resistentes si ellas son secadas adicionalmente en un secador con un medio higroscópico (suelo, arena), favoreciendo la formación de esporas en organismos esporoformadores. Las esporas nos son necesariamente más resistentes por su protección contra la deshidratación.

4.1.5.2 Tiras ó Discos de Papel de Filtro:

Es un método simple y poco laborioso, preserva un amplio número de bacterias, lo cual involucrado el secado sobre papel de filtro Whatman No 4, en tiras ó discos. Para la realización de esta técnica, los discos ó tiras de papel se impregnan con la suspensión, se secan al aire ó en el desecador, y se almacenan en tubo ó tiras de papel plástico transparente estériles en el desecador.

El almacenamiento del desecador en un refrigerador, incrementa la vida del cultivo.

Almacenamiento en papel ha sido exitosamente utilizado para algunas levaduras (Kirsop cap 6) y especies del género *Staphylococcus* (Coe and Clark, 1966) .

Miembros del género *Enterobacteriaceae* son exitosamente almacenados por varios años a partir de una concentración celular de 1×10^8 células.

Después de secado las tiras ó discos de papel pueden ser almacenados en tiras de autoadhesivo plástico, por lo tanto es un método económico para un gran número de cultivos.

Es un método adecuado para el mantenimiento de organismos utilizados en control de calidad. Por otra parte muchos discos de papel pueden ser almacenados en el mismo vial en un tubo tapa rosca.

4.1.5.3 Tapones presecados:

Varios materiales como almidón, peptona y dextran han sido utilizados para hacer tapones presecados, ???sobre los cuales son goteadas suspensión de organismos antes de ser secados y almacenados en condiciones de vacío. Este método ha sido exitosamente utilizado para bacterias que difícilmente pueden ser almacenadas por liofilización tales como *Neisseria gonorrhoeae* y *Vibrio cholerae* (Annear 1956, Malik Cap 4,10)

4.1.5.4 Discos de gelatina:

Se ha reportado que las bacterias pueden sobrevivir por periodos prolongados de tiempo por este método.

Este método ha sido ampliamente utilizado para la conservación de bacterias heterótrofas. La suspensión de microorganismos se centrifuga y se resuspende (10⁸ - 10⁹ células/mL) en un medio con gelatina a 30°C, utilizando pipeta de pasteur estéril se coloca una gota de esta suspensión en la base de una caja de petri y se permite la solidificación, luego se coloca la caja en un desecador con pentóxido de fósforo, después de secados los discos se transfieren a un tubo tapa rosca y se almacenan. Se realizan pequeños *tapones de gelatina*, los cuales pueden ser secados por liofilización y almacenados sobre sílica gel y ó pentóxido de fósforo. El éxito del almacenamiento depende de la temperatura, se ha reportado una mayor recuperación a -20°C, comparada con la temperatura de refrigeración ó a medio ambiente.

Para la recuperación de las células se resuspende un disco de gelatina en el caldo apropiado en condiciones de asepsia.

4.1.5.5 Silica Gel:

Es un método ampliamente utilizado para una variedad de microorganismos, es simple y poco laborioso. Los tubos se llenan hasta la mitad con sílica gel (malla 6-12), grado 40, actividad desecante y se esterilizan en un horno a 180°C x 2 horas. Simultáneamente se prepara la suspensión (1x10⁸ células ó esporas) y se resuspende en 1 a 2 mL de leche descremada al 10% v/v. A partir de esta suspensión se toma 0.5mL a los tubos con sílica previamente enfriados(manteniéndolos en hielo picado), para disminuir el efecto del calor que se genera al absorber el cultivo, los gránulos anhídridos de sílica). Mantener a 0°C por 10 minutos aproximadamente. Luego los tubos se colocan con la tapa entrecerrados, en un desecador que contenga sílica gel por una semana a temperatura ambiente, se secan a 25°C por 2 días. Se sella herméticamente el tubo y se almacena en un desecador que contenga sílica gel con indicador (grado 42, malla 6 - 16).

Levaduras, hongos y bacterias han sido exitosamente conservadas en sílica gel (Sidyakina, Cap 4.5 Kirsop Cap 6)

Ventajas	Desventajas
Riesgo de contaminación menor si se	La estabilidad depende del tipo de

compara con el subcultivo Viabilidad por periodos prolongados de tiempo Costo de equipo menor si se compara con la liofilización Procesos poco laboriosos Utilizado para un amplio rango de microorganismos Método apropiado para el suministro de cultivos Utilizado para el almacenamiento de cepas frecuentemente utilizadas	microorganismo
---	----------------

4.1.5.6 Perlas de Vidrio ó de Porcelana Porosas:

Método ampliamente utilizado para la conservación de una gran variedad de bacterias heterotróficas, 13 de 202 cultivos no fueron viables después de 21 años de almacenamiento en perlas de vidrio.

Las perlas de vidrio o de porcelana que se utilizan son de un diámetro de 2-5mm, se lavan en agua destilada con detergente suave y luego se enjuagan con agua destilada. Para eliminar la alcalinidad de las perlas, se remojan en ácido clorhídrico al 2% por 2 horas y se lavan con abundante agua hasta obtener un pH neutro, se secan en horno. Las perlas se colocan en tubo tapado herméticamente para prevenir la entrada de aire ó humedad, no se recomienda utilizar tapas de plástico ó de caucho por que se pueden derretir en el horno, usar tapones de metal. Simultáneamente se preparan tubos con silica gel con indicador y una mota lana de vidrio, que cubra la silica, todos Los tubos se esterilizan en horno a 180°C por 2 horas.

La suspensión celular se prepara a una concentración de 1×10^8 células, y se resuspende en leche descremada al 10% v/V, se transfieren 20 - 40 perlas a un tubo estéril vacío, se añade 1ml de la suspensión, se agita para impregnar todas las perlas y se remueve el exceso con pipeta de pasteur, luego las perlas son transferidas asépticamente a el tubo con silica y lana de vidrio, se tapa herméticamente asegurando prevenir la entrada de aire ó humedad. Se almacena a temperatura ambiente por 1 semana y luego se refrigera.

4.2 MÉTODOS A LARGO PLAZO:

4.2.1 Liofilización:

Método efectivo para la preservación de una amplia variedad de bacterias y bacteriófagos, favorece el mantenimiento de la viabilidad por más de 50 años y la

preparación de varias replicas simultáneamente, con la utilización de ampollas ó viales, los cuales requieren espacios reducidos para el almacenamiento.

Es un proceso mediante el cual, el agua es removida a partir de una muestra congelada, el agua removida es atrapada en un condensador refrigerado ó en pentóxido de fósforo. De la liofilización resulta un producto estable y fácilmente rehidratable y los cultivos se conservan bajo condiciones de vacío ó en una atmósfera de gases inertes (Buck, C. et al 1991)

4.2.1.1 Equipo

Aunque el proceso implica una labor más o menos intensiva, la liofilización facilita enormemente la distribución y almacenaje de cultivos. De acuerdo a las necesidades y la infraestructura de cada laboratorio, podemos encontrar diversos tipos de liofilizadores que se adapten a las necesidades individuales. La ATCC ha desarrollado cuatro sistemas para la liofilización. Entre ellos encontramos:



- Liofilizador por componentes. Las muestras son liofilizadas en viales internos taponados con algodón que posteriormente son sellados al vacío en viales externos .
- Liofilizador comercial. Utiliza el sistema de doble vial, se consigue comercialmente según las necesidades particulares.
- Preceptrol. En este método , el material es liofilizado en viales de vidrio de suero o penicilina con un tapón y agrafe. Utiliza también liofilizador comercial.

Manifold. Se utilizan ampollas de vidrio en forma de bulbo o tubulares (Buck, C. et al 1991)

4.2.1.2 Etapas del proceso de liofilización

Cuando hablamos en general del proceso de liofilización, podemos dividir este proceso en tres partes; precongelación del producto, secado primario durante el cual, la mayoría del agua es removida, y un secado secundario(Buck,C , et al. 1991). Sin embargo, para obtener resultados óptimos de todo el proceso, es necesario tener especial cuidado en cada una de las etapas que involucra este

proceso. Para este fin dividiremos en 5 las etapas que trataremos con particular atención en nuestro trabajo.

Cada una de estas etapas conlleva estrés para la bacteria, por lo que es necesario desarrollar una metodología que disminuya el riesgo de pérdida del cultivo

Preparación preliminar. Este paso incluye la preparación de los viales, determinar la utilización de soportes para la liofilización y preparación de la suspensión celular.

Preparación de los viales: En el mercado podemos encontrar, una gran variedad de viales que pueden ser utilizados acorde al trabajo que necesitemos realizar y las condiciones de liofilización y volúmenes de muestras. En el caso específico de material biológico, se recomienda el uso de viales pequeños, a fin de manejar volúmenes no superiores a 1 mililitro que nos permitan mejorar el proceso y aspecto del liofilizado.



Quando usamos viales simples podemos encontrar viales en forma de bulbo (ampollas) que son utilizados para congelar una suspensión celular cuando la sucrosa es el agente crioprotector, las ampollas se protegen con algodón de manera que constituyan un filtro, que disminuya el riesgo de contaminación, cuando están abiertas. Estas ampollas al ser selladas herméticamente, impiden la entrada de aire y de humedad, favoreciendo el almacenamiento de los cultivos por periodos prolongados de tiempo. Otro son viales tubulares utilizados cuando el cultivo es suspendido en leche descremada. Los viales deben ser lavados en agua destilada y permitir su secado. Para ello se sumergen en agua destilada y se autoclavan por 15 minutos a 121°C asegurando la penetración del agua, luego se secan los viales en un horno y finalmente se esterilizan por 30 minutos a 121 °C (Gherna,R 1994). Algunos autores recomiendan el lavado con HCl al 2% durante toda la noche y posterior enjuague doble con agua destilada con esterilización en autoclave. Cuando se utilizan viales, los tapones de caucho no pueden ser permeables al aire.

Soporte de liofilización. Una vez listos los viales, preparamos el soporte sobre el cual dispensaremos nuestra suspensión celular se recomienda adicionar a los viales 1 mL de leche descremada estéril al 20%, Luego se congelan a -70°C y se liofilizan por un lapso no superior a 3-4 horas. Al final de este proceso ya tendremos listo nuestro soporte de leche, sobre el cual se va a adicionar la suspensión celular. La preparación de este soporte de leche es recomendada

porque proporciona un soporte a la suspensión microbiana, que evita ser arrastrada en el momento de la sublimación del agua de la muestra.

Preparación de la suspensión celular. El éxito del método depende de la utilización de cultivos microbianos que estén en óptimas condiciones se recomienda y cepas que estén en la fase de crecimiento que le proporcione la mayor estabilidad y viabilidad, lo cual corresponde al final de la fase logarítmica, o al comienzo de la fase estacionaria, en una concentración aproximada de 10^{10} cél/mL (Gherna,R 1994).

Malik en 1992, Kirsop 1990 y Chang 1992, han reportado el uso de células con aproximadamente 8 horas de crecimiento (en fase logarítmica), mientras que Khyrshedd D. Malik 1986 implementó la utilización de células que se encuentren en fase estacionaria de crecimiento o en su fase de esporulación para microorganismos esporoformadores. De acuerdo a lo planteado por Khyrshedd D. Malik, en la tabla 2 se observa en detalle el tiempo de crecimiento celular recomendada para diferentes géneros bacterianos .

Tabla Periodo de Preincubación de algunos Géneros Bacterianos Recomendado para la Preparación de la Suspensión Celular en el proceso de Liofilización

MICROORGANISMO	PREINCUBACION	MICROORGANISMO	PREINCUBACION
<i>Acetobacter</i>	48-72	<i>Klebsiella</i>	36
<i>Acinetobacter</i>	24	<i>Escherichia</i>	24
<i>Aeromonas</i>	24	<i>Klebsiella</i>	24
<i>Agrobacterium</i>	48	<i>Lactobacillus</i>	24-48
<i>Alcaligenes</i>	24	<i>Leuconostoc</i>	24
<i>Arthrobacter</i>	72	<i>Micrococcus</i>	16-18

<i>Azotobacter</i>	72	<i>Nocardia</i>	96 o más
<i>Azomonas</i>	72	<i>Pediococcus</i>	24
<i>Bacillus</i>	96	<i>Propionibacterium</i>	24-72
<i>Bacteroides</i>	48	<i>Proteus</i>	24
<i>Bifidobacterium</i>	24	<i>Pseudomonas</i>	24
<i>Brevibacterium</i>	72	<i>Serratia</i>	24
<i>Cellulomonas</i>	24-48	<i>Sporosarcina</i>	24
<i>Chromobacterium</i>	24	<i>Staphylococcus</i>	18
<i>Citrobacter</i>	24	<i>Streptococcus</i>	24-48
<i>Clostridium</i>	72	<i>Zymomonas</i>	24-48
<i>Corynebacterium</i>	24		
<i>Enterobacter</i>	24		

Tiempos de preincubación de algunos géneros bacterianos recomendados para la liofilización

Congelación. Durante esta etapa se tendrá en cuenta 3 factores importantes y determinantes para el proceso, la velocidad del proceso de congelamiento, la concentración celular en la suspensión y los agentes crioprotectores:

- **Velocidad del proceso de congelamiento.** Existen dos formas diferentes de llevar a cabo el procedimiento. El congelamiento lento reportado por Chang L. 1990, Gherna Robert 1990, Kirsop B.E. 1990, Malick K.A. 1992, tiene como principio reducir progresivamente la temperatura sometiendo en principio la suspensión celular a un baño de hielo, para luego ser llevado a -30°C y finalmente a -70°C , estos autores, argumentan la importancia en la realización del congelamiento de esta manera, por la oportunidad que se da al microorganismo de realizar un proceso adaptativo y crear cierta resistencia al frío. Por otra parte, Doebbler G.F. 1992, Gibson L.F. 1986, Khyrseed D. 1987, Lewis J.G. 1994, Souzu H. 1973, han demostrado en sus diversos estudios, que la realización de un proceso de congelamiento rápido, da lugar a la formación de un cristal de hielo de características más regulares a fin de evitar daños a nivel de membrana y ultraestructuras celulares.
- **Concentración de la suspensión celular.** El éxito del método depende de utilizar cultivos microbianos que estén en óptimas condiciones y conservar las cepas en la fase que le proporciones mayor estabilidad y viabilidad, la cual corresponde al final de la fase logarítmica ó al inicio de la fase estacionaria, en una concentración de 10^8 - 10^{10} células x mL. Cuando se realiza una suspensión con una concentración celular menor a la recomendada, la formación de cristal de hielo se lleva a cabo principalmente sobre la membrana celular, causando serios daños en su permeabilidad, siendo esta la principal causa de letalidad durante el proceso, cuando la concentración es la

recomendada, es decir entre 10^8 - 10^{10} células por mililitro, la formación del de cristal de hielo se lleva a cabo primero, en el espacio intercelular irradiándose a la superficie celular, y si la concentración celular se encuentra por encima de los parámetros ya preestablecidos, el proceso de congelamiento se realizará de manera irregular dentro de la suspensión y quedarán espacios donde no se da lugar a la formación de hielo, traducido en una alta humedad residual luego de la liofilización, factor que juega un papel importante en el periodo de almacenamiento esperado.

- **Agentes crioprotectores.** Cuando una célula es sometida a congelación, se hace necesaria la implementación de un agente crioprotector, sustancia química no electrolítica y de bajo peso molecular, cuyo objetivo es impedir al máximo cualquier daño celular para mantener la viabilidad esperada. Font Graciela 1983, Gao D:Y: 1995, Lewis J.G. 1994, Moreira Tomas 1994, Morichit 1994, han reportado estudios en los que se implementan diferentes agentes crioprotectores y su mecanismo de acción sobre en algunos grupos bacterianos. Estos compuestos deben poseer ciertas propiedades tales como, no ser tóxico, capaz de penetrar la membrana celular fácilmente, y ser capaces de unirse a los electrolitos que incrementan en concentración durante la congelación, ó cuando las moléculas de agua son lentamente congeladas, etc. (Gherna,R1992). En la Tabla se observa una clasificación de los crioprotectores de acuerdo a su mecanismo de acción, así como ejemplos de los mismos. En primer lugar encontramos los crioprotectores que tienen la capacidad de penetrar dentro de la célula estableciendo en ella una suspensión coloidal, en la cual no se llevará a cabo el proceso de congelación. En segundo lugar, se reseñan los compuestos que no penetran, pero que protegen gracias a que tienen la capacidad de establecer enlaces a nivel de membrana, formando una verdadera capa aislante alrededor de la célula retardando la salida de agua y por lo tanto, reduciendo el daño celular causado por la deshidratación y por último tenemos los compuestos de acción indefinida que como su nombre lo indica, aún no se tiene claramente establecido su mecanismo de acción para mantener las células viables luego de la congelación. La ATCC, utiliza los siguientes agentes crioprotectores: leche descremada 20% p/V, sucrosa 12% p/V, dextrán 10%P/V, suero de caballo, inositol, rafinosa y trehalosa.

Tabla . Clasificación de agentes crioprotectores en relación a su mecanismo de acción

<i>Compuestos que penetran</i>	<i>Compuestos que no penetran</i>	<i>Compuestos indefinidos</i>
Dimetilsulfóxido	Polivinilpirrolidona	Extracto de malta
Glicerol	Azúcares, proteínas	Proteínas sanguíneas

Metanol	Polietilenglicol	Leche descremada
---------	------------------	------------------

Sublimación. Proceso que se lleva a cabo directamente en el liofilizador, previa congelación de la muestra. El tiempo que tardará en desecar la muestra dependerá de varios factores entre los que se destacan, el tipo de soporte, y el producto que se quiera obtener, que cumpla con los porcentajes de humedad, aspecto y viabilidad del producto. Cuando el soporte corresponde a leche descremada al 20%, el tiempo de desecado no deberá ser superior a 10 horas, ya que este tipo de producto se desnaturaliza con tiempos mayores de liofilización, lo cual genera mal aspecto al producto y ningún efecto como agente crioprotector Castro H.P. 1997 en estudios previos con *Lactobacillus bulgaricus*, estableció que tiempos prolongados durante esta etapa, constituían una de las principales causas de bajas en la viabilidad.

Durante esta fase, el agua es removida del producto congelado por sublimación, por lo tanto es necesario un medio ambiente que permita que las moléculas de agua migren desde el producto congelado, esto se acompaña por evacuación del área alrededor del producto, para remover moléculas competitivas y dar libre flujo al vapor de agua, de ahí que, la bomba de vacío es un componente esencial del sistema de liofilización. Una trampa de humedad o condensador, colecta las moléculas de agua antes de que estas entren al sistema de la bomba de vacío, este condensador, es una superficie de metal congelado, sobre la cual las moléculas de agua pueden colectarse. La temperatura de este condensador debe ser más baja que la temperatura del producto, para permitir la migración de las moléculas de agua desde el producto. La tasa de sublimación depende de la diferencia en la presión de vapor entre el producto y el condensador (Gherna,R. 1991)

La humedad que permanece en el producto liofilizado, es llamada humedad residual, para asegurar una buena sobrevivencia, la mayoría de los productos liofilizados debe ser secados hasta un contenido de humedad residual de 1% o menos. Algunos estudios han demostrado que 2-3% de humedad residual es requerida para la estabilidad de microorganismos liofilizados. El contenido de humedad residual de la mayoría de productos después del secado primario es aproximadamente 7-8%, por lo tanto es necesario un periodo de secado secundario para muchos materiales. La humedad residual se expresa como peso de la humedad en porcentaje del total del peso del producto. Un método para determinar la humedad residual es pesar el producto y luego remover toda la humedad por sobresecado o secado en un desecador con pentóxido de fósforo hasta obtener un peso constante. La diferencia en peso entre el producto inicial y el producto seco, expresado como porcentaje del peso del producto inicial, es la humedad residual, este es el equilibrio en peso o método gravimétrico. Otro método para determinar la humedad residual de productos liofilizados incluye

cromatografía de gases, cabe aclarar que los análisis de humedad residual son destructivos para el producto (Ghera, R 1991).

Almacenamiento. En esta etapa debe tenerse en cuenta primero la atmósfera, se ha reportado ampliamente (Spengler, A 1992,) que es importante almacenar bajo condiciones de vacío o con una atmósfera de gas inerte, ya que cualquier residuo de oxígeno dentro del vial, puede generar la formación de radicales libres tóxicos para la célula. Otro aspecto a tener en cuenta son los viales, se prefieren viales ámbar, para evitar la exposición a la luz. En cuanto a la temperatura de mantenimiento, se recomienda una temperatura de almacenamiento entre 2 a 8°C. Se ha obtenido una mayor sobrevivencia cuando los cultivos son almacenados a -30 o -70°C en un congelador mecánico. Debido a que el producto liofilizado es higroscópico, deben protegerse de la humedad durante el almacenamiento.

Reconstitución de los viales. Los viales son desinfectados con alcohol al 70%, se flamean los bordes con cuidado y se recomienda manejar los viales en cabina de flujo laminar. Escoger un buen medio de reconstitución para los microorganismos, es también un paso fundamental, para garantizar el éxito de la técnica, puede usarse un caldo enriquecido como el BHI, o una solución al 24% de un carbohidrato de elección, con el fin de brindar a la célula las condiciones necesarias para el crecimiento. Khyrshed A. Malik 1987 resaltan la importancia de que no transcurra más de un minuto entre la apertura del vial y la adición de la solución de rehidratación, así como el permitir que dicho proceso se lleve a cabo en incubación por lo menos por media hora, antes de realizar la siembra en placa o caldo para que la célula realice su proceso de adaptación al medio. El liofilizado se rehidrata adicionando el caldo o la solución elegida, con una jeringa estéril, puede adicionarse 0.3-.04 mL en cada vial, mezclar bien para disolver el pellet completamente, volver a usar la jeringa para transferir .02 mL del cultivo rehidratado a una placa de agar o un medio semisólido de la misma composición. Si se trata de bacterias patógenas, los viales deben abrirse únicamente en cabina de seguridad. Los cultivos liofilizados frecuentemente exhiben un prolongado periodo de adaptación y debe incubarse por periodos extendidos antes de considerar no viable el cultivo.

Monitoreo de la Viabilidad. Aunque la liofilización ha facilitado la preservación de bacterias por periodos prolongados, el monitoreo de la viabilidad debe hacerse antes y después de la liofilización para determinar la efectividad del proceso. Además, se debe realizar la evaluación periódica de la viabilidad y estabilidad de los cultivos para detectar, cualquier cambio ocurrido como resultado del almacenamiento de las cepas. Entre los parámetros recomendados a evaluar, están la viabilidad, pureza, morfología macro y microscópica, estabilidad bioquímica, fisiológica y genética.

4.2.1.3 Efectos de la liofilización sobre el cultivo



Debido al estrés al que son sometidas las células a lo largo del proceso de liofilización, pueden presentarse daños celulares en mayor o menor proporción, reflejados en pérdida de la viabilidad, plásmidos de resistencia o de características bioquímicas entre otros, sin embargo los efectos anteriormente mencionados, pueden disminuirse en la medida que se optimicen las diferentes etapas del proceso de liofilización.

Castro H.P. 1997, en estudios previos demostró que los daños celulares son ocasionados principalmente a nivel de membrana durante el proceso de congelación y sublimación de la muestras. Los efectos a nivel de membrana son tres: cambios en la permeabilidad de la membrana, por pérdida en los gradientes de concentración debido a un desequilibrio hidroelectrolítico a expensas del Na^+ y el K^+ , pérdida de B galactosidasa, en segundo lugar, cambios en el funcionamiento de la membrana por pérdida de la capacidad buffer endógena para equilibrarse con el medio externo y finalmente cambios en la estructura de la membrana a expensas de ácidos grasos saturados e insaturados, ya que durante el procedimiento se puede dar lugar a un proceso oxidativo de los mismos generando alteración en cuanto a su composición química.

Cuando las células son sometidas a la congelación en medio acuoso, el agua líquida que se encuentra alrededor de la célula, comienza a volverse hielo, lo que resulta en un incremento en las concentraciones de solutos externos a la célula. Debido a una presión osmótica diferencial, comienza a darse el desequilibrio en la concentración de sales que favorece la deshidratación celular, lo cual a su vez depende de la velocidad de enfriamiento y la permeabilidad de la membrana.

En la sublimación es importante tener en cuenta el tiempo, durante el cual se lleva a cabo esta etapa, por que se ha reportado pérdidas en la viabilidad, cuando esto se realiza por periodos prolongados. Aquí, dadas las condiciones extremas de vacío y la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso, se debe realizar un control cuidadoso del tiempo de desecado.

Es necesario mencionar que durante el almacenamiento la viabilidad puede afectarse, cuando permanecen residuos de O_2 dentro del vial, pues generan la formación de radicales libres tóxicos para la célula.

Respecto al proceso de rehidratación, debido a las condiciones de almacenamiento, el cambio de atmósfera generado en el momento de destapar el

vial implica nuevos factores incidentes sobre la viabilidad celular, por lo tanto es importante realizar este paso rápidamente en un caldo de enriquecimiento o solución adecuada.

4.2.1.4 Ventajas y Desventajas de la Liofilización

Ventajas de la Liofilización

Este método es ampliamente utilizado para la conservación de bacterias, hongos, levaduras y algunos virus, con menos eficiencia aplicable para la conservación de algas, protozoos, células animales y de plantas.

La liofilización se constituye en uno de los más económicos y efectivos métodos de preservación a largo plazo para bacterias y otros microorganismos. Muchas especies bacterianas diversas fisiológicamente y algunos bacteriófagos, han sido exitosamente preservados por esta técnica, y permanecen viables por cerca de 50 años. El método facilita la elaboración de un gran número de viales simultáneamente, y el pequeño tamaño de los viales facilita el almacenamiento (Gherna, R 1992).

Además, este método minimiza los problemas de riesgo de contaminación y selección de población obtenidos con otros métodos de preservación. Aunque el equipo, en principio es costoso, posteriormente vemos que gracias a los largos periodos de preservación que no ofrece, los gastos de manipulación en cuanto a medios de cultivo, mantenimiento y personal disminuyen en un gran porcentaje el costo total del procedimiento.

Desventajas de la liofilización. Al igual que cualquier otro método de preservación, la liofilización presenta también algunos inconvenientes entre los cuales encontramos el alto costo que tiene el equipo, además el proceso es laborioso lo que hace necesario la participación de personal capacitado para garantizar un buen manejo y procesamiento del material. Aunque la estabilidad que ofrece este método es buena, existe un riesgo de cambios genéticos y pérdida de plásmidos. Se ha reportado en la literatura (Kirsop 1990) que no todas las cepas sobreviven a este proceso y en algunos cultivos puede ocasionar porcentajes bajos de supervivencia. La necesidad de realizar subcultivos para poder evidenciar características morfológicas y el hecho de emplear la totalidad del vial, cada vez que se requiere un subcultivo son otras de las desventajas de este método.

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Utilizado para el suministro de cultivos	Elevado costo de equipos
Mantenimiento de la viabilidad por periodos prolongados de tiempo(> 50 años)	El proceso es laborioso
Baja periodicidad en relación al	En general la estabilidad de las

monitoreo de la viabilidad y estabilidad	características es buena, aunque puede haber selección de la población
Condiciones de almacenamiento con bajos requerimientos	Riesgo de cambios genéticos y pérdida de plasmidos
Espacio reducido para el almacenamiento	La resucitación del cultivo requiere de subcultivos, antes de evidenciar las características morfológicas y fisiológicas típicas.

4.2.2 ALMACENAMIENTO EN NITRÓGENO LÍQUIDO:

La congelación a -140°C (Fase vapor) y -196°C (Fase líquida), ha sido utilizada para la preservación de microorganismos y cultivos celulares que no han sido posibles preservar por otros métodos. Es el método universal utilizado para la preservación de bacterias, hongos, virus, algas, protozoos, levaduras células animales, plantas y tejidos.

Las pérdidas de material biológico, ocurren por el proceso de congelación y descongelación, sin embargo esto se puede disminuir mediante la utilización de agentes crioprotectores y el ajuste en las condiciones de crecimiento, rata de congelación y descongelación.

Este método ha sido considerado un poco costoso, sin embargo el mantenimiento de la viabilidad y estabilidad por períodos prolongados de tiempo, disminuye la manipulación de este, haciendo de este método adecuado para aquellos que consideran el costo del labor.

En general se utilizan células en la mitad de la fase logarítmica, adicionalmente se ha reportado que una rápida descongelación favorece la recuperación celular (37°C), el vial se desinfecta con etanol 70%.

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Longevidad y Estabilidad de los cultivos son mayor que con el de liofilización.	Selección en la población
Durante el almacenamiento se considera que no hay pérdida de material biológico	El nitrógeno líquido se evapora y puede haber disminución ó interrupción de este, lo cual ocasiona la pérdida de colecciones enteras
El proceso es poco laborioso y una vez conservada la cepa la manipulación es poca.	Costo del equipo es alto
Estabilidad y viabilidad por periodos prolongados >23 años	Riesgo de explosión del vial
	No es recomendable para la distribución de cultivos

4.2.2.1 Naturaleza del Criodañ

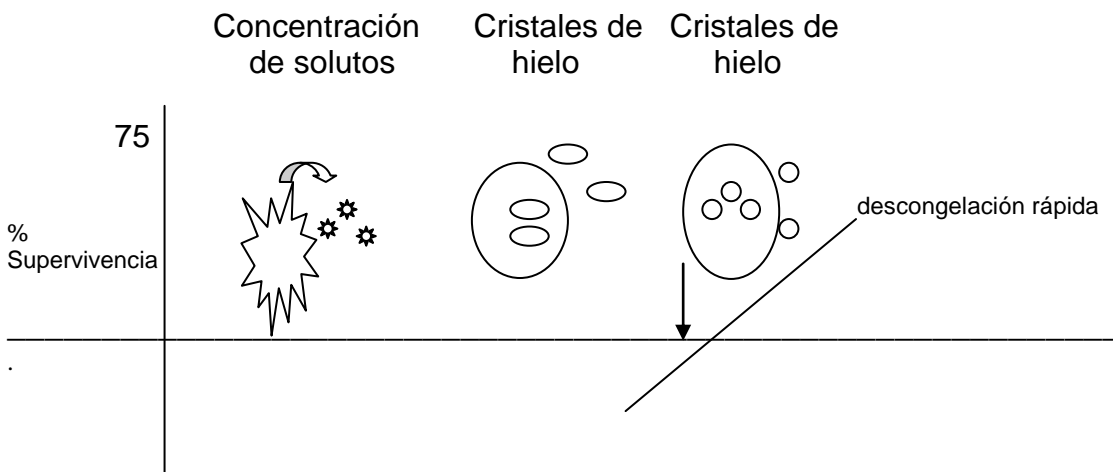
Cuando las células son sometidas a temperatura de congelación, puede causarse un daño celular. Este incluye la formación de cristales de hielo, incremento en la solubilidad de los gases, en la concentración de electrolitos, coloides, sales, carbohidratos, lípidos y proteínas, disminución del pH, cambios en la conductividad calórica y eléctrica, disminución en la actividad de algunas enzimas e incremento en la actividad de otras, acumulación de metabolitos intermedios, espacios intermoleculares reducidos, incremento en los contactos intermoleculares, rompimiento de los enlaces débiles de hidrógeno, dispersión de emulsiones, pérdida de la integridad de la membrana celular, invasión celular por sales tóxicas y mutagénicas e inmovilización de moléculas (Andrew, J and Russel, H, Castro, H 1997, Hunter, J. and Belt 1996).

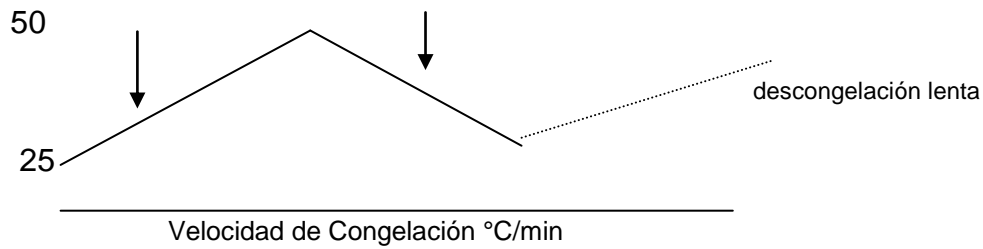
Cuando las suspensiones celulares se congelan en medio acuoso, el agua líquida que se encuentre alrededor de la célula, comienza a volverse hielo lo que resulta en un incremento en las concentraciones de soluto externos a la célula. Debido a una presión osmótica diferencial, comienza a darse el desequilibrio en la concentración de sales que favorecen la deshidratación celular, lo cual a su vez depende de la velocidad de enfriamiento y la permeabilidad de la membrana. Andrew, J and Russel, Hunter, J. and Belt 1996, Calcott, H and Macleod, A.

Además de la adición de crioprotectores a la suspensión celular para minimizar el daño por congelación, es necesario ajustar la velocidad de congelación y descongelación. Cuando la congelación es rápida predomina la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, mientras que si se trata de una congelación lenta, la formación de cristales intracelulares es mínima y el daño es causado por el aumento en la concentración de solutos dentro de la célula. En general, el enfriamiento rápido es más nocivo para las células que el enfriamiento lento.

Con relación a la velocidad de descongelación la literatura aconseja una descongelación rápida ya que los cristales de hielo que se forman cuando las células son congeladas rápidamente crecen más durante la descongelación lenta y presumiblemente producen más daño físico. Es por ello que en este proceso se sugiere una congelación lenta (1 a 3°C /min) y un proceso de descongelación rápida.

Figura Velocidad de Congelación y Descongelación





4.2.2.2 Agentes Crioprotectores

Definición: Son sustancias no electrolíticas de bajo peso molecular como: glicerol, dimetil sulfoxido, azúcares (glucosa, trehalosa, sacarosa, sorbitol, inositol y manitol) y aminoácidos (asparagina, alanina, prolina y serina). Sustancias de alto peso molecular como: albúmina sérica, dextrano y polivinil pirrolidona (PVP), también protegen a las células frente al daño producido por la congelación

Características: Un buen agente crioprotector debe tener las siguientes características:

No debe ser tóxico para la célula

Ser una sustancia no electrolítica

Lijarse a los electrolitos que incrementan su concentración durante la congelación ó a las moléculas de agua para retrasar la congelación.

Tipos: Los crioprotectores se dividen en agentes intracelulares los cuales atraviesan la membrana celular y proveen de protección intra y extra celular, agentes extracelulares que aunque no penetran a la célula ejercen su efecto permitiendo a la membrana oponer resistencia a los fenómenos de ruptura inducidos por hiperosmolaridad.

Existen otros agentes de acción desconocida entre los cuales tenemos la leche descremada, miel, extracto de malta y proteínas sanguíneas (suero, albumina bovina y hemoglobina

La escogencia del crioprotector depende de la especie bacteriana, un test de tolerancia debe realizarse cuando se congelan nuevas especies, para determinar el efecto tóxico ó beneficioso, los crioprotectores más utilizados que generan una protección intra y extra celular son el glicerol y el dimetil sulfóxido. El dextran, glucosa, maltosa, polivinilglicol, polivinilpirolidona, sorbitol y glucosa, aparentemente crean una protección externa a la célula. Las concentraciones a las cuales son utilizadas estas sustancias son: Glicerol 10%v/v, DMS 5%v/v y Sacarosa 15-20%(v/v). El glicerol se esteriliza en autoclave a 121°C, 15 libras por 15 minutos, la sacarosa a 121°C, 10 libras por 13 minutos, el DMS se esteriliza con filtros de teflón de 0.22 micras, prelavados con metanol y DMS. Se almacenan a 5°C y protegidos de la luz, no deben ser utilizados por más de un mes, por la acumulación de productos oxidativos.

Mecanismo de Acción: El efecto crioprotector radica en el hecho de que aquellas sustancias que penetran a la célula reducen la fracción molar de electrolitos destructores. En el caso del glicerol, el efecto protector resulta en la disminución de la concentración de solutos por competencia.

Los componentes de alto peso molecular y no penetrantes, disminuyen el punto de congelación a concentraciones relativamente bajas. Adicionalmente, ellos pueden formar una cápsula viscosa alrededor de la célula retardando la salida de agua y por lo tanto, reduciendo el daño celular causando deshidratación.

CLASIFICACION DE LOS AGENTES CRIOPROTECTORES SEGÚN SU MECANISMO DE ACCION

<i>Agentes Intracelulares</i>	<i>Agentes Extracelulares</i>	<i>Agentes de Acción Desconocida</i>
Glicerol	Azúcares	Leche descremada
Dimetilsulfoxido	Polivinilpirrolidona	Suero
Metanol	Polietilenglicol	Albúmina bovina
Etilenglicol	Dextrano	Extracto de Malta
Acetato de Amonio	Hidroxietilalmidón	Miel
		Hemoglobina

5. PARAMETROS PARA LA EVALUACION DE LOS METODOS DE PRESERVACION

Los métodos de conservación escogidos deben ser evaluados en términos del mantenimiento de las características de interés investigativo ó industrial. Por lo tanto se debe:

- Determinar la característica de interés ó valor industrial ó investigativo, por el cual se va a conservar la cepa. Por ejemplo la capacidad de producción de Interleuquina - 2, en una cepa de *E coli* que ha sido clonada , es la característica de interés que la hace importante para su conservación.
- Establecer pruebas cuantitativas que me permitan evaluar la(s) características de interés antes, durante el proceso de preservación y almacenamiento de las cepas.

Aunque muchas características a evaluar en los cultivos son cualitativas, la estabilidad de los cultivos debe ser evaluada mientras sea posible en forma cuantitativa. Teniendo en cuenta que la evaluación cualitativa, esta sujeta al criterio del laboratorista.

Por otra parte es importante establecer un nivel de expresión de las características, que refleje las condiciones aceptables del cultivo. En el IBUN, con relación a la viabilidad celular, se ha establecido que un recuento menor a 1×10^{-3} UFC/mL es considerado como insuficiente y por lo tanto se debe conservar nuevamente la cepa.

Realizar una caracterización del microorganismo, previa a la preservación de este, para establecer el nivel de expresión inicial de las características, con el fin de determinar el efecto de la preservación sobre el cultivo.

5.1. Características de los Cultivos preservados a ser evaluadas.

Las características a evaluar antes y después del proceso de preservación son, estas a su vez se resumen en la tabla:

- **Viabilidad del Cultivo:** Se determina por recuento en placa de las diluciones que se hacen a partir del vial. Este conteo se expresa como UFC/mL, y se compara los resultados obtenidos, con el recuento obtenido, previo a la preservación de la cepa. Es necesario tener en cuenta que la muerte celular en la mayoría de los métodos de preservación(excepción el subcultivo), ocurre el proceso y el tiempo inicial de almacenamiento. Cuando no es posible, realizar un recuento de placa a partir del material biológico conservado, se recomienda realizar el conteo por microscopia.

- **Pureza del Cultivo:** Puede ser chequeada paralelamente con la determinación de la viabilidad celular.
- **Formación del Producto:** El método utilizado para cuantificar depende del metabolito de interés. Este metabolito debe ser medido antes y después de la preservación, bajo condiciones óptimas.
- **Características Recombinantes:**
 - Plasmidos:** Determinar la presencia ó ausencia del plasmido, la forma más segura de establecer la estabilidad del plásmido, es por secuenciación, sin embargo esta técnica dado el costo no se realiza de rutina, sin embargo técnicas como aislamiento del plasmido, digestión con enzimas de restricción, puede ser realizada de rutina, utilizando una muestra del plasmido como control. La evaluación de la presencia ó ausencia de plasmido debe realizarse en forma periódica de manera que se pueda determinar si el plasmido está o no integrado al cromosoma y que esta en la localización correcta. También pueden ser utilizadas en combinación pruebas de resistencia a antibióticos y la capacidad de fermentar algunos carbohidratos como la glucosa.

Bacteriófagos: El método de ultra congelación ha sido recomendado para la conservación de bacteriófagos. (Clark et al, 1962, Clark and Klein, 1966, Meyle and Kemf 1964) y de librerías lamnda (Nierman et al 1987). Para evaluar la eficiencia de la preservación los títulos deben ser obtenidos antes y después, adicionalmente se evalúa morfología, especificidad del huésped y rata de reacción con el antisuero.

Huésped Recombinantes: Deben ser evaluadas características como: marcadores genéticos, perfil bioquímico y serotipificación. En el laboratorio huéspedes recombinantes son utilizados como hospederos para transformaciones celulares, como la preparación de células competentes, éstas pueden producir una errónea ó baja eficiencia en la transformación, dependiendo de como las células son almacenadas. (Hanahaneta 1991).

Tabla Resumen de las Principales Características a ser Evaluadas

Característica	Ejemplo	Aplicaciones
Viabilidad	<p>Conteo de colonias en placa</p> <p>Conteo de células en el microscopio</p> <p>Cultivos filamentosos: crecimiento radial ó extensión de la hifa a través del tiempo</p>	Todos los cultivos
Pureza	<p>Examinar la contaminación mediante lectura macroscópica y microscópica de los cultivos.</p> <p>También se pueden realizar pruebas como: PFLA/PCR, DNA Hibridización, etc.</p>	Todos los cultivos
Morfología	<p>Lectura Macroscópica: color, pigmentos difusibles, forma, presencia de exudados tipo y cantidad de esporas (lectura microscópica)</p>	Hongos, algas, bacterias y actinomycetes.
Pruebas para Cultivos Celulares Formación de Producto	<p>Caryologia, tumorigenicidad, isoenzimas, producción de anticuerpos</p> <p>Cuantificación periódica de la formación de producto, bajo condiciones definidas</p>	Cultivos Celulares
Rasgos Genéticos	<p>Marcadores de huéspedes thi-</p> <p>Resistencia a antibiótico, tamaño del plasmido, sitio de restricción, secuenciación</p> <p>Formación eficiente de placas, especificidad del huésped, morfología en las placas</p>	<p>Bacterias Huésped</p> <p>Cultivos que contengan plasmidos</p> <p>Bacteriófagos</p>

BIBLIOGRAFIA

LA BIBLIOGRAFIA NO HA SIDO CORREGIDA Y COMPLETADA

H.J.Phaff. (1981) *Scientific American* 245, 52-65 . In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 22-23.

Shannon et al.(1975) The Role of Liquid Nitrogen Refrigeration at the American Type Culture Collection. Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures (A.P. Rinefret and B. La Salle,eds) National Academy of Science, Washington, D.C. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 251.

Deitz, A (1975). Nitrogen Preservation of Stock Cultures of Unicellular and Filamentous Microorganisms. Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures (A.P. Rinefret and B. La Salle,eds) National Academy of Science, Washington, D.C. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 251.

Stevenson, R and Hatt, H (1992). Culture Collection , Functions. Encyclopedia of Microbiology, Volumen 1, ed. Advisory Board. Academic Press, p 615 - 619.

Will, H.(1909). Zentralbl.Bakteriol.,Parasitenkd.Infektionskr.Abt.1 24,405. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 17.

Shackell, L. F. (1909). Am. J. Physiol.24,325-340 In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Hammer, B.W. (1911). J. Med. Res. 24, 527-530. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 17.

Lumiere,A., and Cherrotier, J. (1914), C. Rend.Hebd.Seances Acad. Sci. 158, 1820-1821. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 17.

Rogers, L. A. (1914).J.Infect.Dis. 14, 100-123. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Heller , G.(1941). J. Bacteriol. 41, 109-126 In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Fry , R.M., and Greaves, R. I. N. (1951). J. Hyg. 49, 220-246. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Polge et al., (1949). Nature (London) 164.666. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Miller, R., Jr., and Goodner, K. (1953). Yale J. Biol.Med. 25, 262. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Lovelock, L. E., and Bishop, M.W.H. (1959). Nature (London) 183, 1394-1395. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Annear, D.I.(1958). Aust. J. Exp. Biol. 36, 211-222. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Iijima, T., and Sakane, K.(1970). Jnp J. Freezing Drying 16, 87-91. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Hamada, M. (1982). Jnp J. Freezing Drying 28, 63-67. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 24.

Kocur, M. (1990). In "100 Years of Culture Collections" (L.I.Sly,T.Iijima, and Kirsop, eds), pp. 4-12. Institute for Fermentation, Osaka, Osaka. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 18.

Hunter, J.C., Belt, A., and Halluin, A.P. (1986). Guidelines for Establishing a Culture Collection within a Biotechnology Company. Trends Biotechnol. 4, 5-6. In H.C Jennie and B. Angela. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California ,1996, p 2.

WFCC Standars Committee. (1990). " Guidelines for the Establishmnet and Operation of Collections of Cultures of Microorganims" (D. L. Hawksworth,

de.).World Federation for Culture Collections, Secretariat, Brazil, 16 pp. In Stevenson, R and Hatt, H (1992). Culture Collection , Functions. Encyclopedia of Microbiology, Volumen 1, De. Advisory Board. Academic Press, p 615 - 619.

Kurtzman , C.P. (1992). Culture Collection : Methods and Distribution. Encyclopedia of Microbiology, Volumen 1, ed. Advisory Board. Academic Press, p 621- 625.

Gherna, R.L (1994). Culture Preservation, p 278-292 In P.Gerhardt R. G. E Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed) . Methods for General and Molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Snell, J, J, S. (1991). General Introduction to Maintenance Methodos, p21-26.In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London.

Onions, A. H. S. (1971). In Methods in Microbiology (c. Booth, de), Volume 4,pp.113-151. Academic Press, New York. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London. p.23.

Berger, L. R. (1970). In Proceeding of the First International Conference on Culture Collections (H. Iizuka and T. Hasegawa, eds),pp 265-267. University of Tokyo Press, Tokyo. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London. p. 23

Altkinson, R. G. (1954). Can. J. Bot. 32, 673 - 678. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London. p.24

Kirsop, B. E. (1991). Maintenance of Yeast. p161-182. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London.

Coe, A. W. and Clark, S.P. (1966) . Mon.Bull. Minist. Hlth. 25, 97 -100. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London. p 24.

Annear, D. I. (1956) . J. Hyg., Camb. 54, 487 - 508. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. “ 2de. Academic Press. London. 24

Malik , K. A. (1991) Maintenance of Microorganisms by Simple Methods. P 121-132. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. " 2de. Academic Press. London.

Sidyakina, T.M. (1991). Low - Temperature Freezing of Microorganisms on Silica Gel. P.65-70. In Kirsop and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultred Cells. A Manual of Laboratory Methods. " 2de. Academic Press. London.

Belt, A. (1996). Characterization of Cultures Used for Biotechnology and Industry. Chapter 12.p 251 -258 In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .

Clark, W. A., Horneland, W., and Klein, A. G. (1962) attempts to Freeze some Bacteriophages at Ultralow Temperatures. App. Microbiol. 10, 463-465. In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .p256.

Clark , W. A., and Klein, A. (1966) The Stability of Bacteriophages in Long Term Storage at Liquid Nitrogen Temperatures. Crybiology 3, 68-75. In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .p 256.

Meyle, J. S., and Kempf, J. E. (1964). Preservation of T2 Bacteriophage with Liquid Nitrogen. Appl. Microbiol. 12, 400-402.In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .p 256.

Nierman, W. C., Trypus, C., Deaven, L. L. (1987) . Preservation and Stability of Bacteriophage Lambda libraries by Freezing in Liquid Nitrogen. Biofeedback 5(8), 724-727.In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .p 256.

Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R. (1991). Plasmid Transformation of Escherichia coli and other bacteria. In Methods in Enzymology, Vol 204, pp63-113. Academic Press., New York. In H.C Jennie and B. Angela. 1996*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. 1ª de.Acedemic Press, San Diego, California .p 257.

ANDREW, J and RUSSEL, H. The survival of Injured Microbes. The Society for Applies Bacteriology Symposium seeries No 12. Academic Press London. Pág 45-69

CASTRO, H. Evidence of Membrane Damage in Lactobacillus bulgaricus Following Freeze – Drying. Journal Applied of Microbiology. 1997. Vol 28 pág 87 – 94

HUNTER, J. and BELT, A. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. E.E.U.U, Academic Press. 1996. Pág. 65-81,101-122.

CALCOTT, H and MACLEOD, A. Survival of Escherichia coli from Freeze-thaw Damage: A theoretical and Practical Study

ALARCON, Edna., LOZANO de YUNDA, Amanda. Caracterización fenotípica de Aislamientos Rhizobianos de Acacia y Retamo. Revista Colombiana de Química. Vol.26 (2). 1997

ANDREW M.H.R. and H.D. RUSSELL. The Survival of injured microbes. Academic Press, 1984.

BARBOUR Anne E. and PRIEST F.G. The Preservation of Lactobacilli: A comparison of three methods letters in Applied Microbiology. 1986. Vo 2. Pág 69-71.

BROOK D. Thomas and SMITH David et. al. Microbiología prentice. Hall Hispanoamericana S.A. 1984.

BUCK C et al . ATCC Preservation Methods Freezing and Freeze-Drying. Second Edition. Rockville, Maryland. 1991

CASTAÑEDA urrego Elizabeth and URREGO GUZMAN Miguel. et. al. Microbiología Médica. Manuel de Procedimientos. Instituto Nacional de Salud. 1990.

CHANG L.T. and ELEANDER R.P. Long-Term Preservation of Industrially important Microorganisms The Culture. Vol 1 Pág 55-59. 1994

COX C.S. Oxigen Induced Free Radicals and Viable Decay in Freeze-Dried Bacteria. Sapporo. 1973 p. 55-58.

DOEBBLER G.F. and RINFRET A.P. Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing. Research Laboratory. Vol. 85. p.485

FONT Graciela de Valdes, SAVOY Giori, et al. Comparative study of the Efficiency of some Additives in Protecting Lactic. Acid Bacteria against Freeze-Drying . Cryobiology. 1983. Vol.20. p. 530-566

GAO.D.Y. S.LIN et al. Fracture Phenomena in an isotonic Salt Solution during freezing and their Elimination Using Glycerol. Cryobiology. 1995. Vol. 32. p. 270-284

GHERNA ,Robert L. Culture Preservation. Grow. 1990. p.278-291

GIBSON L.F. and KHOURY J.T. Storage and Survival of Bacteria by Ultra-Freeze. Letter in Applied Microbiology. 1986. Vol.3.p. 127-129

GONDA,K.,OHTOMO,T., and KOGA, S.. Differential Scanning Calorimetry of frozen microbial cells . Sapporo.1973. Vol.5.p. 19-28

HANAFUSA, h. Freezing and Drying of Enzyme Protein.Sapporo. 1973. Vol.5. p.9-18

HIEDA K. Induction of Genetic Change by Drying in Yeast. Sapporo. 1973. Vol.5. p.71-78

ISRAELI EITAN, SHAFFER. T et al. Survival Differences Among Freeze-Dried Genetically Engineered and Wild Type Bacteria. Applied and Enviromental Microbiology.1993. Vol.59. No.2. p. 594-598.

KHYRSHEED, D. MALIK and DIETER Claus. Bacterial Culture: Collections their Importance to Biotechnology and Microbiology. Biotechnology and Engineering Reviews. 1987. Vol. 5p. 137-167

KIRSOP .B.E. DOYLE A. Maintenance of Microorganisms and Culture Cells . Maintenance of Bacteria by Freeze – Drying. 1991

KOHSAKA, Kenji, et al. Preservation de Mycobacterium leprae in Vitro For Four Years by Lyophilization. International Journal of Leprosy. 1993. Vol. 61. No. 3 p. 415-420

KRIEG, N. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology . Baltimore U.S.A. Editorial William and Wilkins 1984

LABCONCO, CORPORATION. Manual de Instrucción ECO. USA. 1-9 1990

LEWIS J.G., et al. Cryoprotection of Yeast by Alcohols During Rapid Freezing. Cryobiology. 1994. Vol. 31. p.

MALICK. K.A Some Universal Media for the Isolation Growth and Purity Checking of Broad Spectrum of Microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1992. Vol. 8. P. 453 - 456

MERK Laboratories. Manual de Medios de Cultivo

MLADENOV. D. A. Et Al. Freeze-drying of biomaterials for the medical practice. Cryobiology. 1993. Vol 30. P. 335 - 348.

MOREIRA TOMAS. ET AL. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnología Aplicada. 1994. Vol. 11. No. 2. P. 113 - 118

MORICHI T. ET AL. Effect of peptone added to the recovery medium on the viability of freeze-dried bacteria. Sapporo. 1973. Vol. 5 P. 47 - 53

PORTAELS Françoise. ET AL. Effects of freezing and thawing on the viability and ultrastructure of in vivo grown mycobacteria. International Journal of Leprosy. 1993. Vol. 56 No. 4. P. 580 - 587

SANCHES Maria Piedad. Manual de procedimientos en bacteriología Clínica. Biobacter. 1992.

SANTACRUZ Clara. Estudio de factibilidad para la selección y montaje de equipos para liofilizar frutos de exportación. Proyecto de grado. 1989. Pontificia Universidad Javeriana.

SERVIN Massieu Manuel. Variants of *Serratia marcescens* induced by freeze-drying. Applied Microbiology. 1969. Vol. 18. No. 4. P. 689 - 691