

Nº 121
281



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

“ METODOS PARA LA CONSERVACION DE CEPAS ”

**TRABAJO ESCRITO VIA EDUCACION CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA**

ISABEL PERALTA MONTANE

MEXICO; D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	PAGINA
Introducción.....	1
Información general sobre el tema.....	2
Métodos de mantenimiento.....	6
Métodos de conservación.....	11
Registro e información de las cepas.....	29
Discusión y conclusiones.....	31
Bibliografía.....	38

INTRODUCCION

En muchas actividades científicas, productivas y analíticas, los microorganismos constituyen un recurso absolutamente indispensable.

Pero para que puedan emplearse con éxito en la enseñanza, en la investigación, en la producción o conversión de biomoléculas, en métodos analíticos microbiológicos, como referencia y en un sin número de otras aplicaciones, debe asegurarse su adecuada conservación.

Conservar a los microorganismos significa mantenerlos viables y estables por el mayor tiempo posible. Existen diversos métodos para conservar microorganismos y en el presente trabajo me aboqué a la revisión de las características de estos métodos y de los criterios para seleccionar el más adecuado para cada caso.

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

La microbiología es la ciencia que estudia a los organismos de tamaño microscópico y sus relaciones con el ambiente y los demás seres vivos. Incluye cinco grandes grupos que son: bacterias, protozoos, algas, hongos, así como virus, que en realidad se encuentran en el límite entre biomoléculas organizadas y seres vivos.

La microbiología estudia todos los aspectos de estos microorganismos: donde se encuentran, sus características, sus relaciones mutuas y con otros grupos de organismos, su control y en general sus efectos para el hombre y su medio ambiente ya que los microorganismos están íntimamente relacionados a nuestra vida. Muchos son habitantes del cuerpo humano; algunos microorganismos causan enfermedades y se emplean en la producción de vacunas y otros están implicados en actividades como la fabricación del vino, queso, yogurth, en la producción de penicilinas y en el proceso de aguas residuales, moderadamente se emplean para las bioconversiones, la producción de enzimas, etc. (10)

La microbiología es una ciencia relativamente joven ya que el primer registro del mundo de los microorganismos fue hecho por Antony Van Leeuwenhoek, quien describió 3 diferentes formas de células algunas esféricas (cocos), cilíndricas o en formas de varillas (bacilos) y en espiral (espirilos); a la fecha, se siguen reconociendo las tres mismas formas generales.

En la búsqueda de microorganismos que pudiesen ser responsables de diferentes enfermedades, Koch y sus colegas desarrollaron varios procedimientos de laboratorio que tuvieron un tremendo impacto sobre el desarrollo de la microbiología.

Entre ellos figuraban procedimientos para teñir bacterias y hacerlas visibles, y técnicas para cultivar a los microorganismos en el laboratorio. (11)

Una importante técnica de cultivo que ellos desarrollaron fue el uso de un extracto de ciertas algas marinas llamado agar-agar, que es un sustrato que puede disolverse en caliente en una solución nutritiva y que al enfriar se gelifica y permanece sólido y transparente en un amplio rango de temperaturas adecuadas para el crecimiento de los microorganismos.

Los medios de agar proporcionaron un método excelente para separar microorganismos, ya que permiten que una célula quede inmovilizada y lo suficientemente separada de otras, para que sólo su descendencia forme una colonia y de ésta manera todas las células sean idénticas; esta población se denomina "clona" y constituye lo que se llama un cultivo puro. (12)

Una vez obtenido y comprobado que se tiene un cultivo puro nos vemos en la necesidad de mantenerlo y conservarlo estable y viable durante el mayor tiempo posible, según las necesidades de investigación, didácticas, de producción, etc.

Viabile significa que se mantenga vivo en una cantidad tal que permita su multiplicación al ser cultivado de nuevo en condiciones específicas.

Estable quiere decir que no sufra alteraciones que nos puedan causar cambios o reacciones diferentes física, bioquímica o estructuralmente.

Para ello se hace uso de diferentes métodos cuya elección depende de las muchas circunstancias asociadas a los cultivos y que son: (17)

I Las características fisiológicas del microorganismo.

II Uso que se dará al microorganismo.

III La resistencia a agentes externos.

IV El material y equipo con que se cuenta y el costo de los procesos.

V El espacio necesario para almacenarlo.

VI La disponibilidad requerida del cultivo.

En el cepario de la Facultad de Química se ha establecido una diferencia entre el mantenimiento y la conservación de las cepas.

(9) (17)

Por mantenimiento se entiende la preservación del cultivo por tiempos relativamente cortos (de 2 semanas a 6 meses), mediante técnicas sencillas que permiten una fácil recuperación.

Las técnicas de mantenimiento de cepas son:

- Subcultivo o mantenimiento en estado activo.
- Subcultivo con actividad reducida, cuyas variantes son almacenamiento a bajas temperaturas, uso de tapones metálicos o con parafina, y almacenamiento en nujol o solución salina.

La conservación en cambio, es la preservación por tiempos prolongados, que además de la viabilidad aseguren la mayor estabilidad de la cepa, aunque la recuperación sea más complicada. Estos métodos requieren más equipo y personal especializado y son principalmente:

- Deseccación.
- Congelación a -20°C , -70°C , o en nitrógeno líquido.
- Liofilización.
- Métodos específicos.

A continuación se analizarán las características de dichos métodos.

MÉTODOS DE MANTENIMIENTO

Subcultivo en estado activo. Consiste en transferir al microorganismo periódicamente a un medio fresco e incubarlo en condiciones óptimas durante el tiempo necesario para alcanzar la fase logarítmica tardía.

Las condiciones más importantes a considerar en la utilización de este método son: (3) (4) (5) (7) (21)

- El medio de cultivo, que debe ser adecuado para cada microorganismo, deben evitarse los medios en los que se den cambios importantes de pH y los selectivos, ya que pueden enmascarar una contaminación.

- La incubación que debe ser en condiciones óptimas, considerando no solo la temperatura, sino todos los parámetros ambientales como; aireación, agitación, luz, humedad, etc. y debe mantenerse únicamente el tiempo necesario para alcanzar la fase logarítmica tardía de desarrollo del microorganismo.

- Las condiciones de almacenamiento, incluyendo, no solo la temperatura, sino también la humedad y protección de la luz.

- El período de resiembra, que debe ser lo más largo posible pero sin comprometer la viabilidad del cultivo, desde luego

depende del microorganismo; por ejemplo, algunas bacterias tales como Staphylococcus spp. y Coliformes pueden sobrevivir por varios meses pero los más delicados como Neisseria spp. pueden requerir un subcultivo cada dos semanas.

Entre las ventajas de este método tenemos que el costo del equipo requerido es muy bajo, siempre se cuenta con cultivos disponibles, y fáciles de obtener, y es aplicable a un gran número de microorganismos.

Entre las desventajas de este método, la que mayor peso tiene es el riesgo de contaminación por la frecuencia de los subcultivos aunque este riesgo puede ser reducido por la ejecución de una buena técnica bacteriológica y por la adecuada prueba de esterilidad del medio de cultivo, antes de usarlo.

(Generalmente se resiembraba en dos tubos, para que uno de ellos se use como " stock " y el otro para hacer las pruebas necesarias y resiembras, reduciendo así el riesgo de contaminación del stock al manipularlo menos. Los riesgos de mal etiquetado o equivocación de cultivos son altos, particularmente cuando las cepas necesitan subcultivos frecuentes. El riesgo se incrementa cuando el operador está fatigado y puede ser disminuido en cierta forma con el máximo orden al etiquetar, acomodar los tubos por sembrar y el inóculo, y en general, por las prácticas adecuadas de trabajo. El etiquetado debe ser tan claro que no haya riesgo de

error en la lectura). (7) (17)

Pero la mayor desventaja de este método es el riesgo de pérdida de estabilidad, que se incrementa con la frecuencia del subcultivo. Un inóculo grande reduce el riesgo de selección de mutantes espontaneas pero requiere mayor cuidado para evitar contaminaciones; desde luego siempre debe probarse la pureza de los subcultivos antes de uso o de enviarlo al solicitante.

Resiembra con actividad metabolica reducida. Estas técnicas se llevan a cabo mediante resiembras periódicas mas espaciadas que el subcultivo normal, aplicando mecanismos para reducir el metabolismo de los microorganismos; estos mecanismos consisten, por ejemplo, en restringir la entrada de aire al medio de cultivo o almacenarlo a bajas temperaturas.

a).- Debe tenerse mucho cuidado de que si se hace por sellado del tubo de cultivo éste quede bien sellado, ya que puede deshidratarse o contaminarse si hay un mal sellado.

b).- Cuando se usan bajas temperaturas deben emplearse anticongelantes como el glicerol al 10 % para evitar la formación de cristales, este anticongelante debe ser estéril, inocuo y no tener inhibidores. (7)

Estos métodos como el anterior, tienen las mismas ventajas agregandose que como requiere menos resiembras, se utilizan menos medios de cultivos y materiales; aunque las desventajas son muy

parecidas nos ofrece la posibilidad de conservar por más tiempo al microorganismo, disminuyendo, aunque poco, los riesgos de contaminación y pérdida de estabilidad.

c).- Para restringir la entrada de aire se utilizan tapones de corcho con parafina o tapones metálicos o bien se cubre al cultivo con una capa de aceite mineral estéril.

Uso de tapones de corcho impregnados de parafina o metálicos.

En esta técnica se siembra al microorganismo en tubos con medio sólido inclinado y cuando ya se ha desarrollado, se sustituye la torunda por un tapón de corcho estéril y se sella con parafina fundida. O bien, se tapa con un tapón metálico, por ejemplo de aluminio.

La eficacia de este método de conservación puede mejorarse para aumentar el tiempo de duración del cultivo, combinandolo con almacenamiento a bajas temperaturas. (21)

Uso de una capa de aceite mineral estéril (nujol). En este método se cultiva al microorganismo en un medio sólido y una vez desarrollado, se le agrega aceite mineral estéril hasta cubrir completamente al medio de cultivo y se tapa con cierre hermético. EL fundamento de este método es el mismo que el anterior, ya que se mantiene la actividad metabólica reducida porque se suprime el intercambio gaseoso, pero presenta la gran ventaja de que permite

tomar a voluntad una muestra del cultivo bajo el aceite, con el alambre de inoculación, para sembrarlo en un medio nuevo, conservando protegido el cultivo original.

Suspensiones de microorganismos en solución salina estéril.

Este método consiste en suspender un cultivo de fase logarítmica tardía en solución salina estéril, en la cual el microorganismo detiene su actividad metabólica por falta de nutrientes, en un ambiente libre de catabolitos e isotónico lo cual evita toxicidad y daño físico . (17)

En el caso de algunos microorganismos halófilos se pueden usar concentraciones mayores de NaCl para mantener al microorganismo en su óptima presión osmótica.

Esta técnica se aplica con muy buenos resultados al mantenimiento de hongos contaminantes y saprófitos, suspendiendo las esporas en solución salina isotónica estéril y almacenando a temperatura ambiente.

Para algunos actinomicetos y bacterias conviene combinar con almacenamiento a baja temperatura, para prolongar la duración del microorganismo en suspensión. (7) (21)

METODOS DE CONSERVACION

Como ya se mencionó se entiende por conservación la preservación por períodos de, por lo menos 6 meses para cepas muy sensibles, hasta 15 años ó mas.

A continuación se analizan brevemente las características y aplicaciones de los más importantes:

- Desecación.
- Congelación.
- Liofilización.

DESECACION O DESHIDRACION

La desecación como método de conservación ha sido extensamente usado. Existen varias técnicas pero todas consisten en remover el agua y prevenir la rehidratación. (3) (7) (21)

Este método se realiza colocando una suspensión del microorganismo en un soporte inerte y estéril y se provoca la deshidratación en condiciones específicas de secado, dependiendo del microorganismo de que se trate. El envase donde se coloca el soporte estéril con el inóculo debe sellarse después del secado.

El fundamento de este método es que se disminuye la actividad metabólica debido a que baja la a_w , es decir que no hay agua disponible para reacciones metabólicas. Esta técnica se puede realizar con los siguientes soportes: arena, suelo, kieselguhr y sílica gel. Los hongos esporulados sobreviven por secado sobre

suelo y varias especies han sido conservadas por períodos mayores a diez años sin cambios en sus características.

Discos o tiras de papel. El almacenamiento sobre papel ha sido ampliamente usado para algunas levaduras y Staphylococcus ssp. después de deshidratadas pueden almacenarse en paquetes dentro de contenedores herméticamente cerrados o entre tiras de plástico adhesivo, proporcionando un método barato para el envío postal de un gran número de cultivos. (3)

Tabletas pre-deshidratadas. Varios materiales tales como el almidón, la peptona o dextrosa se usan para hacer tabletas pre-deshidratadas sobre las cuales se coloca por goteo, pequeños volúmenes de la suspensión del microorganismo; después de esto se secan y almacenan al vacío. Este método ha sido aplicado a bacterias muy delicadas como Neisseria gonorrhoeae y Vibrio cholerae, las que son muy difíciles de liofilizar. (3) (7)

Discos de gelatina. En éste método, originalmente descrito por Stamp (1947) , los organismos se suspenden en un medio nutritivo de gelatina, se colocan gotas de esta suspensión en cajas Petri estériles y se deja solidificar.

Las gotas ya secas pueden liofilizarse o deshidratarse y los discos resultantes se almacenan en sílica gel o pentóxido de fósforo. Una gran variedad de bacterias han sido conservadas por éste método y se ha reportado viabilidad y estabilidad después de

3 a 10 años, según la cepa de que se trate.

Existen una gran variedad de soportes para conservar a los microorganismos por el método de secado, pero en general el tiempo de supervivencia varía dependiendo de los siguientes factores.

- 1).- La clase de microorganismo.
- 2).- El material sobre el que los microorganismos se desecan.
- 3).- La perfección del proceso de desecación.
- 4).- Las condiciones físicas a las que se expone al organismo desecado, por ejemplo; luz, temperatura y humedad.

Algunos investigadores han descrito modificaciones o procedimientos sencillos de secado para la conservación de cultivos; los siguientes son algunos de los más notables:

a) Una rápida deshidratación al vacío, bajo un desecante o una combinación de dos es preferible a una lenta deshidratación.

b) La presencia de materiales protectores por ejemplo; una leche bacteriológica o suero aumentan la supervivencia.

c) Los cultivos deshidratados se conservan vivos por más tiempo si se refrigeran, que si se mantienen a temperatura ambiente.

d) Se tienen algunas otras referencias: Brown conservó cepas de Streptococcus, Pneumococcus y Streptococcus haemolyticus por 4 a 12 años, deshidratadas en suero o en sangre, sobre piezas de papel filtro, dentro de botellas con vacío, conteniendo cloruro de

calcio. Rhodes reportó 88 % desupervivencia por períodos mayores a 13 años de 61 generos de hongos, que conservó desecando suspensiones de esporas y micelio en gotas de suero de caballo; la deshidratación la realizo con pentóxido de fósforo y al vacío, seguida de sellado

En cepas de Blastocladiaceae absorvidos en tiras de papel filtro, deshidratadas lentamente, se ha tenido una alta supervivencia después de 12 a 17 años.

Entre los métodos de conservación a largo plazo, la desecación puede ser muy útil y eficaz, pero no es la mejor selección sin antes probarlo con cada cepa y soporte en particular. La viabilidad por largo tiempo se ha encontrado moderadamente buena; la estabilidad de las características de la cepa parece ser muy específica de cada caso. La contaminación es probablemente menor que en el método de los subcultivos. El costo del equipo es bajo y ninguna de las técnicas involucra una gran labor manual en relación a la viabilidad esperada. Por la simplicidad de las técnicas algunas pueden utilizarse para almacenar gran número de microorganismos y la recuperación es en general, muy sencilla. (3) (5) (7) (21)

CONGELACION

Este método se basa en la reducción de la actividad metabólica a temperaturas muy bajas. Aunque el congelamiento inicial mata a algunas células, la mayor parte de éstas sobreviven y permanecen viables y estables durante prolongados períodos; se considera que estas células están en estado latente.

La congelación por sí misma provoca daños irreparables a las células, para minimizar estos efectos dañinos como son la formación de cristales de hielo y las altas concentraciones de sales que resultan al congelar los líquidos de las células deben considerarse los siguientes factores: (3) (5) (7) (21)

- La velocidad de congelación puede causar la formación de cristales que provoquen daño físico en las células.

- El uso de agentes crioprotectores como el glicerol o el dimetil sulfoxido (DMSO) al 10% reduce los efectos electrolíticos durante la congelación; estos agentes deben ser estériles y no contener ningún inhibidor, también se recomienda una mezcla de 8 % de azúcar y 10 % de DMSO, y una variedad de azúcares, aminoácidos, polialcoholes, poliésteres incluyendo polivinil-pirrolidona, suero de mamíferos hasta el medio de Nylor y Smith's, pero en general es necesario, determinar para cada cepa y temperatura de congelación cual es mejor protector.

La edad fisiológica del cultivo también es importante; se ha detectado que las células en fase estacionaria de crecimiento

presentan mayor resistencia a los daños físicos.

Finalmente la velocidad de descongelación es otro factor muy importante; debe ser controlada para evitar los choques térmicos; la temperatura a la cual se lleve a cabo y sobre todo el tiempo, varían según la temperatura de congelación y el microorganismo, pero constituye una dificultad en la recuperación y un punto que debe controlarse con sumo cuidado. Para la conservación por congelación, existen tres variantes: (3) (5) (7) (21)

a) Congelación a -20°C .

b) Almacenamiento en dióxido de carbono sólido o nieve carbónica a -70°C .

c) Almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C .

En todos los casos la muestra se prepara para obtener una suspensión muy concentrada del microorganismo en un medio de cultivo, conteniendo un agente crioprotector; la suspensión se coloca dentro de pequeños viales o ampollitas, se sella y se congela a velocidad controlada, según el tipo de método utilizado, el medio en el cual se suspende al microorganismo varía dependiendo de las características propias del microorganismo y puede ser desde agua destilada estéril hasta soluciones con un alto contenido de azúcares.

Las ampollitas o viales se almacenan en congelación lo cual constituye una de las principales limitaciones del método, pues

cada ampollita procesada mantiene ocupado un espacio en el equipo, que es costoso en general.

Cuando se usa la congelación en nitrógeno líquido, deben considerarse los siguientes aspectos:

a) El nitrógeno se evapora continuamente y debe reponerse periódicamente.

b) El cuarto en el cual se almacenan los contenedores debe estar bien ventilado y contar con alarmas que indiquen deficiencias de oxígeno, ya que una concentración de 19 % de oxígeno en el medio ambiente se considera el nivel mínimo de seguridad para estar en contacto con nitrógeno. Cuando se encuentran de 16 a 17 % de oxígeno se presentan vértigos, de 14 a 15 % de oxígeno se presenta torpeza, retortijones, calambres y vómito y cuando el oxígeno baja a tan solo 12 % o menos de 14 % mezclado con nitrógeno se han reportado muertes con tan solo 20 o 30 segundos de exposición a esta mezcla. (7)

c) Cuando las ampollitas conteniendo la cepa se sumergen en nitrógeno líquido, éste puede penetrar en una grieta o falla de la ampollita y cuando se le saca del almacenamiento se expande el nitrógeno causando que la ampollita explote. Este peligro para el personal y el medio ambiente se elimina colocando las ampollitas en un contenedor de acero que aunque no evita la pérdida del cultivo, si protege al personal, o bien utilizando nitrógeno en fase gaseosa para almacenar las ampollitas o usando materiales

suaves para contener a los microorganismos, por ejemplo los hongos no-patógenos pueden congelarse dentro de popotes. (21)

d) Los contenedores con nitrógeno líquido deben ser escurridos y limpiados periódicamente y reaprovisionados, con el nitrógeno que se haya evaporado.

La congelación en nitrógeno líquido se usa para conservar bacterias, virus, hongos y preparados celulares; el equipo que se necesita es comparable en costo y mantenimiento con el usado para la liofilización, pero se mantiene ocupado para almacenar las cepas conservadas. Este método no se puede aplicar a microorganismos sensibles al frío y presenta una baja viabilidad por los daños celulares que provoca, además de que es difícil la recuperación.

Como ventajas de la congelación sobre otros métodos de conservación, se tiene que es aplicable a un gran número de microorganismos, las cepas así conservadas, presentan una gran estabilidad y se mantienen por largo tiempo dependiendo del tipo de microorganismo.

Por ejemplo, Helicobacter pylori es difícil de aislar a partir de biopsias gástricas, pero es aún más difícil de conservar. Pierde viabilidad en menos de 7 pases, cuando se subcultiva, y la liofilización causa muerte total en los cultivos.

Para conservar Helicobacter pylori la única posible selección es la congelación a -70°C o preferentemente en nitrógeno líquido,

a -193° C con un crioprotector como mucina de cerdo al 10 % (19)

Otro ejemplo interesante es el de la conservación de cepas de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), reportada por Yoh y cols de la Universidad de Osaka, quienes encontraron que la toxigenicidad se pierde fácilmente en cepas liofilizadas, pero se mantiene estable en cepas conservadas a -80° C en tripticasa soya caldo + 20 % de glicerol. Ellos mismos recomiendan a falta de congeladores el mantenimiento en tubos inclinados con medio de huevo de Dorset, compuesto por huevo de pollo en NaCl al 0.9 % en relación de 4:1 y almacenados a 4° C para no perder la toxigenicidad. (20)

Kepes y Kepes vislumbraban una importante aplicación de la congelación a -80° C y -193° C para conservar cultivos en crecimiento sincrónico con esta cualidad. (2)

La congelación ultra rápida a velocidades de enfriamiento de 400° C/min. también ha dado buenos resultados para la conservación de especies de Pseudomonas y Arthrobacter del suelo. Sidiyákina y colaboradores (12) han aplicado la congelación ultra rápida a estas especies y a mezclas de ellas, con el propósito de llegar a una satisfactoria criopreservación de comunidades microbianas en ambientes naturales, como el suelo bajo la hipótesis de que dicho hábitat natural juega un papel muy importante en la resistencia de las células al "stress" causado por la congelación.

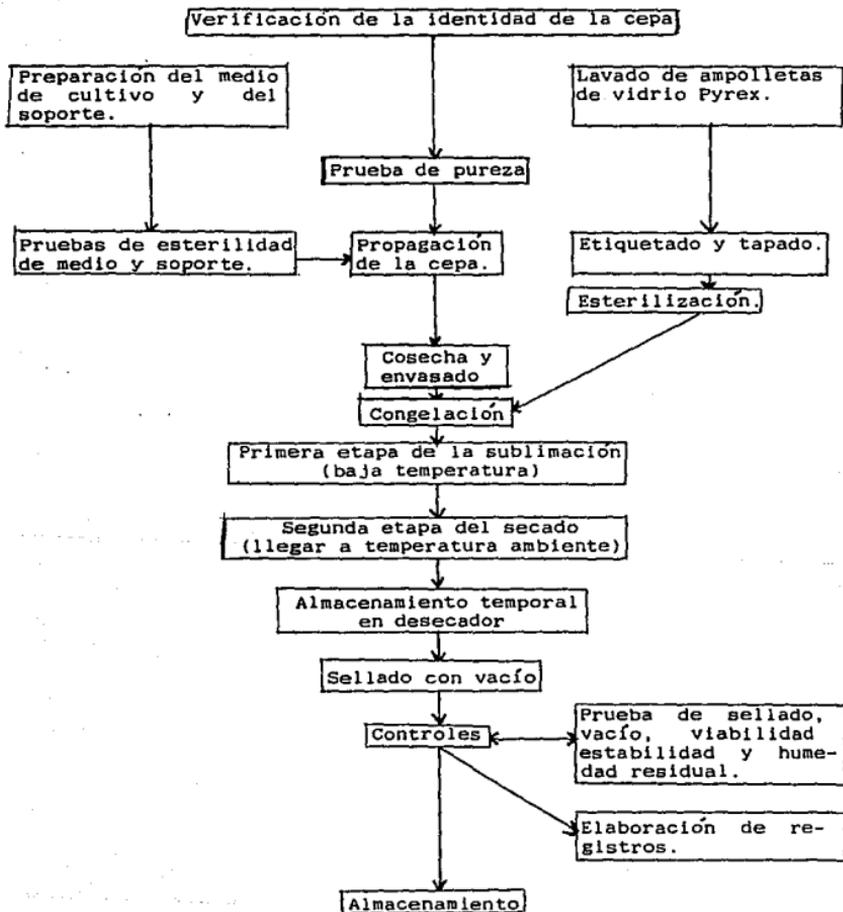
LIOFILIZACION

La liofilización es un método de secado a temperaturas muy bajas, se logra congelando el material, en este caso, la suspensión microbiana a temperaturas de -70°C a -90°C y sometiendo a vacío del orden de 50 micrones de Hg para sublimar el hielo y desecar las células. (9) (21)

Se utilizan suspensiones concentradas de células que como mínimo debe contener 10^8 células / ml en un agente crioprotector y se distribuyen en pequeños viales o ampollitas; se congelan a temperaturas de -70°C a -90°C en una mezcla de hielo seco y dióxido de carbono. Se recomienda colocar las ampollitas ligeramente inclinadas para que al congelarse se forme una cuña, o sea, una capa más delgada de hielo y que al sublimarse la capa inferior del vial no se deshiele y provoque espuma, lo cual causaría un aumento en la mortalidad del cultivo. Una vez congelada la suspensión, se somete a alto vacío, el hielo presente se sublima y se deshidrata la suspensión bacteriana; como el hielo pasa directamente a fase de vapor la estructura de los microorganismos se conserva con un mínimo de daño a las delicadas estructuras celulares. Los viales o ampollitas se sellan y se almacenan en refrigeración.

El siguiente diagrama muestra las etapas del proceso de liofilización.

DIAGRAMA DEL PROCESO DE LIOFILIZACION



La liofilización da excelentes resultados, aunque el proceso es costoso, laborioso y algo complejo; por ello es muy importante que sea realizado por personal especializado y que se consideren los siguientes factores.

a) Es primordial tener seguridad en la identidad de la cepa, antes de proceder a su conservación. Además, al momento de propagarla, cosecharla y al terminar el proceso deben hacerse pruebas de pureza. (1) (2) (8)

b) La suspensión microbiana debe ser lo mas concentrada posible; 10^8 células/ml es el mínimo indispensable en la suspensión para lograr una adecuada supervivencia. En las cepas de fácil y abundante crecimiento se usan suspensiones con 10^{12} a 10^{10} células/ml.

c) La edad fisiológica del cultivo es determinante para la supervivencia y la recuperación. En general se cosechan células de fase logarítmica tardía, pero para ciertos microorganismos es preferible utilizar esporas.

d) La selección del agente crioprotector es otro punto muy importante; existe una amplia variedad de suspensiones y flúidos disponibles en el comercio, además de los que uno puede preparar por conveniencia para alguna cepa en particular; estos agentes protectores son necesarios, tanto para prevenir la total deshidratación como para neutralizar los efectos de los

electrolitos. Los más utilizados son productos naturales complejos tales como el suero y la leche descremada al 10 % así como algunos carbohidratos: glucosa, sacarosa, inositol o dextranas. Otros agentes protectores que son utilizados van desde la gelatina, polivipirrolidona, glutamato, peptona al 10 % en agua y polioles como adonitol y beta-glicerofosfato, entre otros. (7) (1) (2) (6)

e) Las ampollitas o viales deben ser de vidrio Pyrex, pues es el único que resiste la congelación, el vacío y el sellado.

f) Las ampollitas o viales deben identificarse cuidadosamente; para evitar errores se usa el grabado en el vidrio con números que no sean fáciles de confundir o las etiquetas dentro de las ampollitas, asegurando su inocuidad y su legibilidad. (21)

g) El envasado de la suspensión debe realizarse con sumo cuidado para evitar errores, contaminaciones introducidas por un mal manejo y defectos que se hagan evidentes al finalizar el proceso, como chorreado de las paredes o daño en las etiquetas.

(7) (17) (21)

h) Durante el proceso deben evitarse la descongelación y/o la formación de espuma, pues ambas cosas producen daño celular.

En la parte final del secado, la temperatura debe incrementarse lentamente hasta igualar la temperatura ambiente.

i) La humedad residual debe ser de 1 a 4 %. Si es menor,

puede haber daño celular y si queda más de 4 % la actividad del agua (a_w) es insuficiente para detener toda actividad celular.

Una vez retiradas de la liofilizadora las ampollitas deben transferirse a un desecador, en tanto son selladas.

j) El sellado de las ampollitas, debe efectuarse lo más rápidamente posible y puede llevarse a cabo bajo vacío o con un gas inerte.

k) Después del sellado se inspecciona cada ampollita para checar que no haya grietas o defectos de sellado y en su caso, que haya vacío.

l) Las cepas liofilizadas se almacenan en la obscuridad y preferentemente a una temperatura fría estable; la refrigeración a 4° C da muy buenos resultados, excepto en el caso de microorganismos sensibles al frío que se conservan mejor a temperatura ambiente.

m) Cuando se trabaja con patógenos peligrosos se requiere de un procedimiento estándar, los organismos clasificados en el HOWIC CODE OF PRACTICE (DHSS, 1978) como patógenos categoría * A * o categoría * B * están sujetos a prácticas bien definidas para el laboratorio usando gabinetes de seguridad aprobados, personal calificado y especializado, accesos restringidos, etapas de contención y así sucesivamente. Según experiencias de la NCTC, la centrifugación por sí misma es peligrosa ya que puede suceder algún accidente por grietas en las ampollitas o durante el etiquetado o el embalaje. Las ampollitas conteniendo patógenos peligrosos tienen que ser procesadas con sus tapones de algodón

insertados a una adecuada profundidad, se precongela en dióxido de carbono sólido pulverizado antes de transferirlas a la liofilizadora.

Se recomienda el uso de una pequeña unidad de liofilización esterilizable exclusiva para este tipo de microorganismo ya que en algunos modelos la esterilización de la maquinaria no es muy fácil. (7) (21)

RECUPERACION.- Después de un buen proceso de liofilización para contar con un buen cultivo, se requiere una adecuada recuperación del microorganismo liofilizado. El porcentaje de recuperación depende de la rehidratación y el manejo subsecuente. (7) (21)

Se ha determinado que la temperatura a la cual se efectúa la rehidratación, la velocidad de calentamiento y el volumen del medio de rehidratación producen efectos diversos. El mayor efecto, sin embargo es el de la composición del medio de rehidratación.

Aunque la liofilización solo remueve agua, la simple rehidratación con agua no es satisfactoria, probablemente porque se presentan fenómenos osmóticos que dañan a la membrana.

Se ha encontrado que la recuperación de Spirillum atlanticum se incrementa usando una suspensión con 24 % de sacarosa en vez de agua destilada para rehidratar.

En general, para recuperar cepas bacterianas, se recomienda

usar algún caldo nutriente como el medio de rehidratación.

Hay que tomar en cuenta que las ampollitas que han sido cerradas al vacío deben ser cascadas suavemente para permitir que el aire penetre muy lentamente. (7) (21)

El medio de rehidratación se adiciona sobre el material liofilizado con una pipeta Pasteur estéril y se mezcla suave y cuidadosamente, evitando la formación de espuma y la posible creación de aerosol, ya que éste contamina el ambiente.

El material rehidratado se transfiere a un medio de cultivo fresco, probado de esterilidad y se incuba.

Reactivación.- Las cepas liofilizadas pueden utilizarse generalmente después de la primera siembra y en ocasiones directamente del liofilizado pero en algunas ocasiones, como en el caso de otros métodos de conservación, se requiere una reactivación que consiste en, resebrar la cepa por lo menos 2 ó 3 veces cada 12 horas por el tiempo indispensable para llegar, a la fase logarítmica media. (9) (17)

Si la cepa esta congelada o refrigerada se le adiciona medio fresco frío y se deja a temperatura ambiente para que alcance el equilibrio con la temperatura del cuarto; después se incuba a la temperatura óptima del microorganismo.

Si la cepa está seca se puede recuperar adicionando un medio líquido nutritivo moderado, se deja hidratar en un lugar fresco,

por 1 a 4 horas y después se incuba a temperatura óptima. (17)

Finalmente, en las cepas liofilizadas es especialmente importante la realización de controles periódicos de viabilidad y estabilidad, dado el largo tiempo de conservación que permite este método.

Si hubiese alteraciones de la estabilidad o si las cuentas han bajado, es necesario rehidratar y hacer una nueva liofilización.

Estos controles deben hacerse anual o semestralmente, según el microorganismo de que se trate y desde luego, deben registrarse todas las pruebas y resultados en el expediente de cada cepa; conviene graficar la viabilidad vs tiempo para reemplazar el lote liofilizado si hay un cambio en la pendiente.

Ventajas y desventajas.- Entre las muchas ventajas de la liofilización están la gran estabilidad del producto, la facilidad de la distribución del producto, por ser el envase tan pequeño como viales o ampollitas; las células así conservadas se mantienen por tiempos más largos de los logrados con otros métodos de conservación, el espacio requerido para almacenar cepas liofilizadas es muy pequeño y fácil de mantener, si se le compara con el requerido para la conservación con nitrógeno líquido; también se reducen los daños que sufren las células por la aplicación de muy bajas temperaturas, y los riesgos de errores y contaminaciones; finalmente la liofilización no ofrece riesgos en

la recuperación y su realización es muy sencilla. (3) (4) (7) (21)

Este método posee también algunas desventajas, por ejemplo que requiere de equipo muy costoso para realizar el proceso; se requiere además de personal bien capacitado y especializado. Como se puede ver hasta aquí, la desventaja estriba en el costo de la inversión y, por último hay algunos microorganismos que, dadas sus características particulares no resisten la liofilización.

Sin embargo, la liofilización sigue siendo el método de elección para un gran número de cepas en materia de conservación a largo plazo y constantemente se estudia, adapta y mejora el método para diversos fines.

Por ejemplo, para actinomicetos de uso industrial permite la mejor conservación posible, evitando la degeneración por subcultivo que conduce a la pérdida de la capacidad de producir algún metabolito de interés industrial probablemente por la pérdida de plásmidos.

la recuperación y su realización es muy sencilla. (3) (4) (7) (21)

Este método posee también algunas desventajas, por ejemplo que requiere de equipo muy costoso para realizar el proceso; se requiere además de personal bien capacitado y especializado. Como se puede ver hasta aquí, la desventaja estriba en el costo de la inversión y, por último hay algunos microorganismos que, dadas sus características particulares no resisten la liofilización.

Sin embargo, la liofilización sigue siendo el método de elección para un gran número de cepas en materia de conservación a largo plazo y constantemente se estudia, adapta y mejora el método para diversos fines.

Por ejemplo, para actinomicetos de uso industrial permite la mejor conservación posible, evitando la degeneración por subcultivo que conduce a la pérdida de la capacidad de producir algún metabolito de interés industrial probablemente por la pérdida de plásmidos.

REGISTRO E INFORMACION DE LAS CEPAS

Cualquiera que sea el método de conservación seleccionado, es indispensable marcar cuidadosamente cada disco, ampollita o vial, asegurándose de que no haya lugar a confusiones y mantener un expediente con los datos de la cepa y del proceso de conservación. (17)

Las etiquetas o grabado de discos, ampollitas o viales deben tener el nombre y número de microorganismo, el número de proceso (lío-filización, congelación, etc) y la fecha; las etiquetas se usan dentro del vial o ampollita, manteniendo los datos libres de suspensión microbiana; los discos de papel y celulosa se marcan directamente.

- El expediente de cada cepa debe contener la siguiente información: (21) (7) (9) (17)

- El nombre vigente de la cepa, su número de registro y, en un recuadro específico, la sinonimia y los números de registro en otras colecciones.

- Los datos de su origen, tales como donador y forma de localización, o bien fuente de aislamiento, método, personas que realizaron el aislamiento y la identificación.

- Los resultados de las pruebas realizadas; pureza, morfología, macro y microscópica, características bioquímicas,

serológicas, genéticas, productos de biosíntesis, requerimientos nutricionales, etc., señalando método de prueba.

También deben señalarse en los registros los resultados atípicos.

- Las referencias bibliográficas pertinentes.

- Los datos del proceso de conservación: persona (s) que realice los preparativos, pruebas, proceso y controles; fecha, equipo utilizado e incidentes si los hubiera. Generalmente se cuenta con procedimientos estandarizados y descritos en manuales, pero se debe registrar cualquier variación del procedimiento típico.

- Los resultados de los controles realizados después del proceso y periódicamente durante el almacenamiento.

- La existencia de unidades conservadas (discos, frascos viales o ampulas), el control del almacenamiento y, cuando sea el caso, las personas e instituciones a quien se haya proporcionado dicha cepa, indicando solicitud fecha, responsables de entregar y de recibir la cepa, uso que se le dará, etc

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Al hacer una revisión crítica de los métodos usados para la conservación de los microorganismos se ha encontrado que, aunque la liofilización tiene amplias ventajas sobre los otros, no es aplicable a todos los casos, y que además de hacer una cuidadosa selección del método de conservación, basada en los criterios mencionados, sólo los controles posteriores nos pueden asegurar si se están logrando la viabilidad y la estabilidad de la cepa. Además de considerar los criterios de selección mencionados pueden hacerse las siguientes recomendaciones para la conservación de los microorganismos de los diversos grupos.

ALGAS. La mayoría de cultivos se mantienen por crecimiento continuo en condiciones óptimas, incluyendo iluminación. El período transcurrido entre subcultivos puede alargarse mediante bajas temperaturas que van de 10° a 15°C y puede ser tan largo como varios meses. Algunas especies difíciles de manejar como ciertas algas azul-verde, pueden ser deshidratadas bajo corrientes de aire y pueden sobrevivir varios meses. Por ejemplo Nostoc. Otras pueden mantenerse bajo aceite mineral, como Tolypothrix, Tenuix y Calotrix brevissima. También se aplican el secado sobre tierra volcánica y la liofilización. Cuando el ambiente de los microorganismos es relativamente complejo, o cuando hay agregados

celulares, se presentan problemas particulares en la congelación y probablemente también en la liofilización. La resistencia a la congelación puede ser afectada por la temperatura específica para el crecimiento del microorganismo, por la velocidad de congelación y por la presencia o ausencia de agentes crioprotectores no obstante el almacenamiento en nitrógeno líquido ha sido usado para algunas especies, como Euglena gracilis y otras algas verdes unicelulares y se le ha considerado como el método más prometedor para estos casos.

BACTERIAS. Todos los métodos de conservación han sido aplicados a bacterias; en términos generales, el método más conveniente para su conservación a largo plazo ha sido la liofilización, aunque para algunas especies su aplicación no es adecuada, por ejemplo: la mayoría de las autótrofas no resisten la liofilización, por lo que el almacenamiento en nitrógeno líquido es lo más conveniente.

Cuando se presentan problemas en la liofilización, es aconsejable revisar lo realizado y tratar de obtener el mejor crecimiento inicial y así liofilizar una población muy densa, también debe revisarse el trabajo para reducir el retraso entre las etapas de liofilización y el almacenamiento a bajas temperaturas; si se toman como rutina estas precauciones se podrá esperar una mayor sobrevivencia y mejores resultados del método.

(3) (4) (7)

RICKETTSIAS Y CHLAMYDACEAS. La mayoría de las especies pueden conservarse por liofilización satisfactoriamente; la American Type Culture Collection utiliza de preferencia este método para Rickettsias y Chlamydias. (4) (7) (21)

ESPIROQUETAS. Son organismos muy delicados y difíciles de mantener aún con series de subcultivos, razón por la cual algunas especies no han sido cultivadas "in vitro". Sin embargo algunas especies, Treponema pallidum y especies de Leptospira se conservan, en nitrógeno líquido con agentes crioprotectores y solo unas pocas han sido liofilizadas; entre ellas tenemos algunas especies de Leptospira, Borrelia y Treponema. Otras han sido deshidratadas sobre tabletas pre-fabricadas de peptona-almidón como son Leptospira y Treponema. (4)

BACTERIOFAGOS. La liofilización, el secado por ejemplo sobre discos de papel, el almacenamiento como suspensión en un caldo nutriente son métodos muy acertados, para conservar bacteriófagos; el almacenamiento se hace a 22° C, 4° C o -70° C, según el espécimen. Los contenedores deben ser herméticos y mantenerse al abrigo de la luz.

Algunos autores recomiendan el almacenamiento bajo nitrógeno líquido como el método más acertado para su conservación a largo plazo. También ha dado excelentes resultados la liofilización de la bacteria hospedera, en ciclo lisogénico, es decir con el

bacteriófago dentro. (4)

LINEAS CELULARES. La conservación a bajas temperaturas - 70° C o en nitrógeno líquido -196° C son las más utilizadas para las células primarias, células diploides o líneas celulares continuas (Stevenson, 1964); los agentes crioprotectores son muy necesarios, tales como el dimetil sulfóxido o el glicerol.

La velocidad de congelación y la de descongelación son los factores más importantes a controlar en líneas celulares que con microorganismos, debido al daño que pueden causar.

HONGOS. Algunos hongos soportan la liofilización sobre soportes como el suero, soluciones de azúcares o leche descremada; la desecación siempre puede ser utilizada para algunas especies. La mayoría puede conservarse fácilmente en nitrógeno líquido con el apoyo de agentes crioprotectores. Se ha probado que existen algunos grupos de hongos que no soportan la liofilización entre ellos tenemos a los Entomophthorales, los Phycomycetes acuáticos, los que forman micelio estricto y algunas especies con esporas delicadas. El almacenamiento de hongos con actividad metabólica reducida, bajo aceite mineral o en solución salina, son técnicas muy usadas para conservarlos. En cambio la transferencia o subcultivo tiende rápidamente a pleomorfizarlos. (4) (7) (14)

MYCOPLASMAS. Algunas especies resisten la liofilización y su almacenamiento por varios años (4), aunque se maneje una viabilidad pobre inicialmente. Algunos compuestos protectores

usados para la liofilización de bacterias y de virus no tienen efectos sobre la viabilidad de Mycoplasmas.

La conservación por congelación a varias temperaturas y el almacenamiento en nitrógeno líquido han sido probados con especies difíciles de liofilizar, logrando buenos resultados. También han sido conservados sobre bloques de agar a -30° C; las especies más delicadas pueden sobrevivir mejor a -70° C, como M. pneumoniae. (4) (7)

LEVADURAS. Los métodos usados para conservar hongos son satisfactorios para las levaduras especialmente la liofilización y la deshidratación sobre pastillas de celulosa o preservadas bajo nitrógeno líquido; (Tsuji, 1966) hay que poner especial atención en la constitución del medio para que el poder fermentativo original sea retenido. (4) (7)

PROTOZOOS. Como con las algas el mantenimiento por subcultivo es el más frecuentemente usado. El almacenamiento a bajas temperaturas entre 10° a 15° C puede aumentar la longevidad de los subcultivos. La liofilización ha sido utilizada para solo unos pocos protozoos, como son especies de Amoebae, Stentor y Frontonia. (4) (7)

La conservación de Strigomonas oncopelti por deshidratación sobre tabletas pre-fabricadas de peptona-almidón ha sido reportada (Annear; 1956) y también la viabilidad de este

mismo organismo despues de haber sido deshidratado de la fase líquida de una solución de glucosa al 50 %

Para los miembros de este grupo el almacenamiento a bajas temperaturas usando un agente crioprotector es un método útil para varias especies; generalmente se almacenan a -70° C con el uso de bióxido de carbono sólido y también se ha utilizado la conservación en nitrógeno líquido para especies de Crithidia, Entamoeba, Paramecium, Tetrahymena, Toxoplasma, Trichomonas y Trypanosomas, entre otras. La viabilidad a bajas temperaturas varía considerablemente con la temperatura de almacenamiento. Para algunas especies hay viabilidad por unos meses (Mc Entergart, 1959) y para otras por años (Diamond, 1964). La liofilización se aplica con buenos resultados a algunos protozoarios, especialmente ciliados y flagelados.

VIRUS. En general los virus de plantas son más fáciles de conservar que los virus de origen animal y la conservación a largo plazo de algunos virus de plantas puede ser realizada por deshidratación del tejido infectado de la planta, o por liofilización; algunos otros han sido conservados por congelación a bajas temperaturas o por almacenamiento en nitrógeno líquido. (4)

Algunos virus animales han sido conservados por períodos cortos por refrigeración a 4° C en solución salina normal o en

soluciones de glicerol, (Ward, 1968).

La liofilización con varios soportes se ha usado para la conservación de algunos virus animales como son los causantes de las paperas, influenza, polio, rubeola, así como varios virus del herpes, y el virus de la vaccinia, entre otros. (1) (4) (7)

Muchos otros virus son liofilizados por la American Type Culture Collection (Catalogo de virus, Rickettsias y Clamidias, 1971 (7)). La congelación con el apoyo de agentes protectores también se usa para conservar virus animales. (3)

Los virus animales varían grandemente en su resistencia a la congelación, a la liofilización y al almacenamiento. Algunos virus necesitan contínuos subcultivos en células vivas; algunos pueden sobrevivir por solo unos días y otros por años. (7)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Faruk B. T. and Candan G.C. ''Freeze-Drying of Lactobacillus acidophilus ''Journal of Food Protection. 52 No.4, Ankara, Turkia. 1989.
- 2.- Kepes F. and Kepes A. ''Freeze preservation of synchrony in cultures of Enterobacteriaceae synchronized by continuous phasing phosphate--limited media '' Biotechnology and Bioengineering 26 No. 11, Paris, Francia. 1984.
- 3.- Kirsop B.E. and Snell J.J.S. Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods. Norwich,UK. 1984.
- 4.- Lapage S.P. Redway K.F. Preservation of bacteria whith notes on other microorganisms. Ed.Board. 1974.
- 5.- Labeda P.D. Isolation of biotechnological organisms from nature. Mac Graw Hill, Estados Unidos. 1990.
- 6.- Lelevied H.L.M.'' The use of continuous cultures for selection and isolation of microorganisms producing extracellular enzymes adapted to extreme environments '' Biotechnology and Bioengineering. 24 No.6, The Netherlands. 1982.

7.- Norris J.R. and Richmond M.H. Assay in applied microbiology.
Ed. John Wiley and Sons, E.U.A. 1981.

8.- Odlaug E.T. Caputo A.R. Graham S.G. "Heat resistance and
population stability of liophilized Bacillus subtilis spores"
Applied and Environmental Microbiology. 41 No.6, Illinois, 1981.

9.- Ortegón A.A. " Liofilización como proceso de conservación "
Manual cepearlo de la Facultad de Química
U.N.A.M. México, 1989.

10.- Pelczar J.M. Jr. E.C.S. Foss P.M. Elementos de microbiología.
4a Ed. Mac Graw Hill, E.U.A. 1984.

11.- Pelczar J.M. Jr. and Reid D.R. Elementos de microbiología, 2a
Ed. Mac Graw Hill, E.U.A. 1980.

12.- Sidiyakina T.M. Lozitskaya N.D. Dobrovolkaya T.G. and
Kalakoutskaa L.V. "Cryopreservation of various types of soil
bacteria and mixture thereof " Cryobiology 29. Moscou, U.R.S.S.
1992.

13.- Pereda A.A.L., Salgado A.L., Mota L., Mungia J.L., Galindez J.
" Comparación de diferentes soportes para la liofilización de
bacterias lácticas de interés industrial "Revista latinoamericana
de Microbiología 32 No.6, I.P.N. Mexico D.F. 1981.

14.- Shapton D.A. and Board R.G. " Preservation of fungal
cultures and the control..." Safety in Microbiology. Ed.
Academic Press, Somerset England. 1972.

15.- Stalpers J.A., Hoog A. and Vlug I.H. " Improvement of the
straw technique for the preservation of fungi in nitrogen
liquid". Micology 79 No.1. The Netherlands, 1987.

16.- Valdez de F.G., de Giori S.G., de Ruiz Holgado P.A., y Oliver
G. "Effect of drying medium on residual moisture content and
viability of freeze-dried latic acid bacteriae" Applied
and Environmental Microbiology. 42 No.2, U.N.T. Tucuman,
Argentina. 1985.

17.- Velazquez M.O. " Métodos de mantenimiento y conservación de
microorganismos " Curso de educación continua. U.N.A.M., México.
1990.

18.- Zierdt H.CH. ''Stabilities of liophilized Staphylococcus aureus typing bacteriophages'' Applied and Environmental Microbiology. 54 No.10, Bethesda, Maryland. 1988.

19.- Ansorg R., Von G.R. Pomarius R. and Schmid E.N. ''Evaluation of technique for isolation, subcultivo and preservation de Helicobacter pylori'' Journal of Clinical Microbiology. Essen Universitat, F.R. Germany. 1990.

20.- Yoh M., Marita I., Honda T. Miwatani T. and Nishibuchi M. ''Comparison of preservation methods for enterotoxigenic Escherichia coli producing heat-labile enterotoxin '' Journal of Clinical Microbiology. University Osaka, Japon. 1991.

21.- Norris J. R. Ribbons D.W. ''Methods in microbiology'' 3A, Academic Press, E.U.A. 1970.