



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

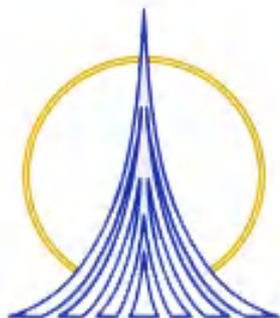
---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE  
CONSERVACIÓN DE BACTERIAS POR  
CONGELACIÓN A  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
PRESENTA:  
**RICARDO SORIANO ATENÓGENES**



**DIRECTOR DE TESIS**  
Mtra. Dora Alicia Pérez González

**ASESOR DE TESIS**  
QFB. Patricia Vidal Millán

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

**DEDICADA A:**

Mis padres **Samuel Soriano Ramos y Lourdes Atenógenes Maya** por todas sus enseñanzas, consejos que me han dado, gracias por su confianza y apoyo incondicional, este logro también es de ustedes. Los amo y esta es la mejor herencia que me han dejado.

Mis hermanos **Edgar y Fernando** por ser parte de mi vida y estar conmigo en las buenas y en las malas, además de sus consejos. Siempre compartiremos nuestros triunfos y alegrías.

Mis amigos **Magali, Ana, Gerardo, Edson, Carlos** por todos los momentos memorables en esta Facultad y gracias por su valiosa amistad, no olvidare nuestra hermandad.

**Norma Leticia Gutiérrez** por todo tu apoyo, amistad, confianza y los bellos momentos que hemos compartido, nunca te olvidare.

**Mtra. Dora Alicia Pérez González** por el apoyo, tiempo y enseñanzas en la realización de este trabajo, gran parte de este trabajo es de usted por su gran esfuerzo y paciencia. Siempre la admirare y la recordare con mucho cariño.

---

---

**AGRADECIMIENTOS A:**

**Q.F.B. Patricia Vidal Meléndez** por ser mi asesora en este trabajo, además la disponibilidad, consejos y el gran apoyo que siempre tuvo hacia mi persona, mil gracias.

Mis sinodales **I.B.Q. Susana Méndez Vázquez, Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz y Q.F.B. Gabriel Alejandro Romero Díaz** por su valiosa enseñanza, paciencia y dedicación para revisar mi trabajo, enriqueciendo con sus conocimientos el contenido de esta tesis.

Y a todos mis profesores de la carrera de Q.F.B. de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, y a esta gran Institución que es la UNAM.

---

---

| <b>ÍNDICE</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>RESUMEN</b>  | 1             |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | 3             |
| <b>I. MARCO TEÓRICO</b>   | 5             |
| <b>1.1 Colecciones de cultivos</b>                                      | 5             |
| <b>1.1.1 El papel de las colecciones de cultivos</b>                    | 5             |
| <b>1.1.2 Cultivos tipo</b>  | 7             |
| <b>1.2 Desarrollo óptimo de los microorganismos</b>                     | 7             |
| <b>1.2.1 Métodos de siembra</b>   | 7             |
| <b>1.2.1.1 Estría en placa</b>  | 8             |
| <b>1.2.1.2 Vaciado en placa</b>   | 8             |
| <b>1.2.1.3 Dilución</b>   | 8             |
| <b>1.2.1.4 Cultivo enriquecido</b>                                      | 8             |
| <b>1.3 Problemas en el mantenimiento estable de los microorganismos</b> | 9             |
| <b>1.3.1 Problemas de degeneración y pérdida de cepas</b>               | 9             |
| <b>1.3.1.1 Contaminación por otros microorganismos</b>                  | 10            |
| <b>1.3.1.2 Infestación por ácaros</b>                                   | 10            |
| <b>1.3.1.3 Infestaciones por fagos</b>                                  | 10            |
| <b>1.3.1.4 Mutación</b>   | 11            |
| <b>1.3.1.5 Personal inexperto</b>                                       | 11            |
| <b>1.3.2 Condiciones físicas que afectan a los microorganismos</b>      | 11            |
| <b>1.4 Conservación y mantenimiento de cepas</b>                        | 13            |
| <b>1.4.1 Mantenimiento de los cultivos</b>                              | 14            |
| <b>1.4.1.1 Medio inclinado y caldo de cultivo</b>                       | 14            |
| <b>1.4.1.2 Capa de aceite superficial</b>                               | 14            |
| <b>1.4.1.3 Tierra</b>   | 14            |

---

---

|   |    |
|---|----|
| <b>1.4.2 Almacenamiento y conservación de bacterias</b>   | 15 |
| <b>1.4.2.1 Transferencia periódica</b>                    | 15 |
| <b>1.4.2.2 Reducción del metabolismo</b>                  | 15 |
| <b>1.4.2.3 Secado</b>                                     | 15 |
| <b>1.4.2.4 Liofilización</b>                              | 16 |
| <b>1.4.2.5 Crioconservación</b>                           | 16 |
| <b>1.4.2.6 Congelación</b>                                | 17 |
| <b>1.5 Los principios de congelación</b>                  | 17 |
| <b>1.5.1 Los agentes crioprotectores</b>                  | 18 |
| <b>1.5.1.1 Agentes penetrantes</b>                        | 20 |
| <b>1.5.1.2 Agentes no penetrantes</b>                     | 20 |
| <b>1.6 Congelación</b>                                    | 21 |
| <b>1.6.1 Velocidad de congelación</b>                     | 21 |
| <b>1.6.1.1 Congelación lenta</b>                          | 22 |
| <b>1.6.1.2. Congelación rápida</b>                        | 22 |
| <b>1.6.1.3. Congelación por pasos</b>                     | 22 |
| <b>1.6.2 Congelación en los sistemas celulares</b>        | 22 |
| <b>1.6.3 Congelación eutéctica</b>                        | 23 |
| <b>1.6.4 Daño celular, criolesión</b>                     | 23 |
| <b>1.7 Cuantificación de la viabilidad celular</b>        | 25 |
| <b>1.8 Antecedentes de los microorganismos de estudio</b> | 25 |
| <b>1.8.1 Enterobacterias</b>                              | 25 |
| <b>1.8.1.1 Género <i>Enterobacter</i></b>                 | 26 |
| <b>1.8.1.2 Género <i>Escherichia</i></b>                  | 26 |
| <b>1.8.1.3 Género <i>Klebsiella</i></b>                   | 27 |
| <b>1.8.1.4 Género <i>Proteus</i></b>                      | 28 |
| <b>1.8.2 Género <i>Staphylococcus</i></b>                 | 28 |
| <b>1.8.3 Género <i>Streptococcus</i></b>                  | 30 |

---

---

|   |    |
|---|----|
| <b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>   | 31 |
| <b>III. HIPÓTESIS</b>   | 32 |
| <b>IV. OBJETIVOS</b>  | 33 |
| <b>4.1 Objetivo general</b>   | 33 |
| <b>4.2 Objetivos particulares</b>   | 33 |
| <b>V. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>   | 34 |
| <b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 35 |
| <b>6.1 Material</b>   | 35 |
| <b>6.2 Material biológico</b>   | 35 |
| <b>6.3 Equipos</b>  | 35 |
| <b>6.4 Medios de cultivo y reactivos</b>  | 36 |
| <b>6.5 Método</b>   | 36 |
| <b>6.5.1 Medios y condiciones de cultivo</b>  | 36 |
| <b>6.5.2 Caracterización de las cepas</b>   | 37 |
| <b>6.5.2.1 Prueba oxidasa</b>   | 37 |
| <b>6.5.2.2 Producción de movilidad, indol y ornitina<br/>                    descarboxilasa</b> | 37 |
| <b>6.5.2.3 Prueba rojo de metilo y reacción Voges-Proskauer</b>                                 | 37 |
| <b>6.5.2.4 Hidrólisis de urea</b>   | 37 |
| <b>6.5.2.5 Fenilalanina desaminasa</b>  | 38 |
| <b>6.5.2.6 Descarboxilación de la lisina</b>  | 38 |

---

---

|   |    |
|---|----|
| 6.5.2.7 Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa junto a formación de H <sub>2</sub> S | 38 |
| 6.5.2.8 Licuefacción de gelatina  | 39 |
| 6.5.2.9 Fermentación de hidratos de carbono   | 39 |
| 6.5.2.10 Utilización de citrato   | 39 |
| 6.5.2.11 Utilización de acetato   | 39 |
| 6.5.2.12 Reducción de nitrato   | 40 |
| 6.5.2.13 Agar para prueba DNAsa (Desoxirribonucleasa)                                     | 40 |
| 6.5.2.14 Prueba catalasa  | 40 |
| 6.5.2.15 Hemólisis  | 41 |
| 6.5.3 Preparación de la suspensión de las bacterias                                       | 43 |
| 6.5.4 Método Miles y Misra para recuento de viabilidad                                    | 45 |
| <b>VII. RESULTADOS</b>  | 47 |
| <b>VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>   | 61 |
| <b>IX. CONCLUSIONES</b>   | 69 |
| <b>X. PROPUESTAS</b>  | 70 |
| <b>REFERENCIAS</b>  | 71 |

---

---

## RESUMEN

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, los cultivos bacterianos son mantenidos por el método de transferencia periódica en agar inclinado, estos presentan pérdidas por contaminación, degeneración y mutación. Las colecciones de cultivo, en la actualidad, para su conservación emplean la liofilización y la crioconservación, pero cuando los recursos necesarios son escasos se emplean alternativas menos costosas, es por esto que el presente trabajo tiene como finalidad el implementar el método de conservación por congelación a -20 °C que pueda mantener y conservar las células bacterianas con un rango de viabilidad amplio y estable, además que presente menor costo para su utilización.

Las especies bacterianas utilizadas fueron: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y ATCC 49461. Estas cepas fueron caracterizadas fenotípicamente y posteriormente cultivadas en agar soya tripticaseína, se hicieron suspensiones bacterianas en caldo Todd Hewitt y glicerol al 10%, y suspensiones control, caldo Todd Hewitt sin glicerol. Asépticamente se distribuyó la mezcla dentro de criotubos, los cuales se colocaron en contenedores, manteniéndose en congelación a -20 °C por un período de 180 días.

Para comprobar la eficacia del método, cada 15 días se evaluó la viabilidad de las suspensiones bacterianas por el método de Miles y Misra, en el cual, se hicieron diluciones de cada cepa, en el rango de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , inoculando con una micropipeta 10  $\mu$ L de cada dilución en una placa con agar soya tripticaseína dividida en 8 cuadrantes, incubando a 37 °C por 18 horas, calculando la UFC/mL de cada cepa, para obtener el porcentaje de viabilidad, presentando al final del estudio los siguientes resultados para las suspensiones con crioprotector: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 del 43.18%, *Escherichia coli* ATCC 25922 del 35.71%, *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131 del 41.46%, *Proteus vulgaris* ATCC 49132 del 52.27%, *Staphylococcus*

*epidermidis* ATCC 12228 40.0%, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461 42.19% y *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 del 36.96%. Lo que hace concluir que el método de congelación a -20 °C nos proporciona una conservación que al disminuir el metabolismo de las células microbianas, garantiza la estabilidad evitando la aparición de variantes genéticas.

## INTRODUCCIÓN

Las colecciones de cepas microbianas tienen su origen desde que los bacteriólogos eran los primeros capaces de aislar un cultivo puro a partir de cultivos mixtos de microorganismos, y siempre han sido un importante aspecto de la microbiología, ya sea usándolos como una fuente en los propósitos de enseñanza o como material de referencia en investigación. Aunque el campo de la microbiología ha tenido un incremento en el énfasis molecular, la necesidad de colecciones de cultivos no ha disminuido, ya que estas proporcionan una continuidad con el pasado a través de la conservación y distribución de cepas microbianas descritas o citadas en publicaciones.<sup>1</sup>

La conservación de microorganismos para su almacenamiento ha existido durante décadas. Hay colecciones de cultivo extensas que dependen de métodos, como la liofilización o crioconservación, para conservar una gran diversidad de células para su futura propagación. Estas cepas son distribuidas usando las técnicas de conservación que los hacen cultivos estables y transportables.<sup>2</sup>

Numerosas instituciones mantienen colecciones viables de microorganismos, ya sea con fines docentes, de investigación o para disponer de cepas patrón útiles en el aseguramiento de la calidad de múltiples procesos industriales, evaluación de materias primas, productos y tecnologías. En la actualidad, para la conservación de estos cultivos por períodos largos se emplean la liofilización y la crioconservación, como métodos de elección que aseguran la viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas. Cuando no existen los recursos necesarios para la utilización de éstas técnicas la búsqueda de alternativas de conservación menos costosas es constante.<sup>3</sup>

Uno de estos métodos son las suspensiones de bacterias en medio líquido con un crioprotector, depositados en un congelador a -20 °C. De esta forma muchos microorganismos permanecen vivos durante períodos largos, aunque se deben de tomar precauciones para evitar la formación de mezclas eutécticas, las cuales pueden causar pérdidas en la viabilidad.<sup>4</sup>

Por lo general, las bacterias se pueden guardar a -20 °C durante uno a tres años, a -70 °C durante uno a diez años, mientras que la congelación en nitrógeno líquido conserva las bacterias por 30 años. Además después de 12-18 meses la viabilidad de especies patógenas conservadas sin preservantes decaen en un 20% del inóculo inicial, mientras las bacterias conservadas con crioprotector mantienen una viabilidad entre el 80 al 90%.<sup>5</sup>

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Colecciones de cultivos

Se llama cultivo al proceso de propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en crecimiento están haciendo replicas de sí mismos, y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química. Los nutrientes deben brindarles estos elementos de manera accesible desde el punto de vista metabólico, además de los factores que deben regularse durante el crecimiento como el pH, la temperatura, aeración, humedad y presión osmótica.<sup>6</sup>

El método más simple en la obtención de cultivos puros de microorganismos es la adquisición de subcultivos previamente aislados pertenecientes a una colección. Existen numerosas colecciones de cultivo que van desde pequeñas colecciones privadas a grandes colecciones públicas que pueden mantener millares de cepas de microorganismos. Las colecciones privadas están usualmente asociadas con investigaciones especializadas en industrias, universidades, o institutos.<sup>2</sup>

La función básica de una colección de cultivo es la conservación, el almacenamiento y la distribución de los microorganismos, estas colecciones pueden almacenar bacterias, levaduras, hongos, actinomicetos y protozoarios. La necesidad de preservar y mantener estos microorganismos ha llevado a la formación de colecciones de cultivo en todo el mundo.<sup>7,8</sup>

#### 1.1.1 El papel de las colecciones de cultivos

La importancia de una cepa en particular es que puede servir como referencia para los investigadores, médicos o en ensayos de una aplicación patente para un producto o proceso en que este involucrado. Las colecciones de cultivos proporcionan el material biológico en investigaciones de alta calidad, además estos sirven de almacenes de microorganismos y como fuentes de información en artículos científicos que pueden usarse en la confirmación de resultados. Las colecciones de cultivo más conocidas en el mundo son enlistadas en el cuadro 1.<sup>1,9</sup>

Cuadro 1. Algunas de las mayores colecciones de cultivos bacterianas.<sup>1, 10</sup>

| Colección |   |
|-----------|---|
| ATCC      | American Type Culture Collection.<br>USA  |
| NRRL      | Northern Regional Research Laboratories,<br>Northern Utilization Branch, Agricultural<br>Research Service. Peoria.<br>USA                 |
| QM        | Quartermaster Culture Collection,<br>Quartermaster Research and Engineering<br>Command.<br>USA  |
| WC        | Waksman Collection, Institute of<br>Microbiology, Rutgers, The State<br>University, New Brunswick, N. J.<br>USA                           |
| CBS       | Centraalbureau voor Schimmelcultures,<br>Baarn.<br>Holanda  |
| BCCM /LMG | Belgian Coordinated Collections of<br>Microorganisms, Laboratorium voor<br>Microbiologic, Universiteit Gent.<br>Bélgica                   |
| DSMZ /GCM | Deutsche Sammlung von<br>Mikroorganismen und Zellkulturen<br>GmbH (German Collection of<br>Microorganisms and cell Cultures),<br>Alemania |
| IAM       | Institute of Applied Microbiology,<br>Universidad de Tokio.<br>Japón  |
| IFO       | Institute for Fermentation, Osaka.<br>Japón   |
| JCM       | Japan Collection Microorganisms.<br>Japón   |
| CMI       | Commonwealth Mycological Institute,<br>Surrey.<br>Inglaterra  |
| NCIB      | National Collection of Industrial Bacteria.<br>Inglaterra   |
| NCTC      | National Collection of Type Cultures.<br>Inglaterra   |
| NCYC      | National Collection of Yeast Cultures.<br>Gran Bretaña  |

### 1.1.2 Cultivos tipo

La mayoría de los laboratorios necesitan cepas estandarizadas, también conocidas como cultivos tipo que se utilizan en ensayos como controles de determinadas pruebas. Estos pueden cultivarse periódicamente, con el consiguiente riesgo de contaminación y la selección involuntaria de mutantes. Es precisamente por las mutaciones de los cultivos bacterianos por lo que los cultivos tipo varían con tanta frecuencia de un laboratorio a otro. Los métodos usados en el mantenimiento de cultivos deben especificar un número mínimo de períodos de transferencia para reducir la posible contaminación o el cambio genético.<sup>2,4</sup>

Para superar estas dificultades los microorganismos se conservan liofilizados y durante el transcurso de su almacenamiento se comprueba su pureza, para tener la seguridad de que concuerdan con las descripciones oficiales de la cepas estándar o cepas tipo.<sup>4</sup>

## 1.2 Desarrollo óptimo de los microorganismos

Un cultivo microbiano debe tener ciertos atributos generales si el proceso que genera es operable, sin importar la simplicidad o complejidad del proceso diseñado: la cepa debe ser genéticamente estable, crecer vigorosa y rápidamente después de la inoculación y deberá ser un cultivo puro libre de otros microorganismos.<sup>8</sup>

Los nutrimentos en el medio de cultivo deben contener todos los elementos necesarios para la síntesis biológica de nuevos microorganismos, es decir todos los elementos integrales de las macromoléculas: aminoácidos, purinas, pirimidinas y pentosas (precursores metabólicos de los ácidos nucleicos), carbohidratos adicionales (precursores de los polisacáridos), ácidos grasos y compuestos isoprenoides.<sup>6</sup>

### 1.2.1 Métodos de siembra

El uso de medios sólidos ha sido utilizado por muchos años en la obtención de cultivos de levaduras, bacterias y hongos cada uno produce colonias diferentes. Las muestras se pueden inocular sobre medios sólidos, de manera semicuantitativa mediante

la inoculación con asa o en forma cuantitativa por medio de un proceso de dilución. Los cultivos puros usualmente se pueden obtener utilizando una de estas variaciones.<sup>2, 11</sup>

**1.2.1.1 Estría en placa.** Para favorecer el crecimiento, el aislamiento y la selección específica del microorganismo, los inóculos de la muestra por lo general son sembrados sobre la superficie de las placas, utilizando un asa para hacer una serie de líneas paralelas no sobrepuestas en la superficie del medio sólido, la estría original se cruza con una asa para obtener colonias aisladas, para favorecer el aislamiento el asa de inoculación debe flamearse para la esterilización entre estriado del cuadrante siguiente. Por lo general las placas se siembra en cuatro cuadrantes.<sup>2, 11</sup>

**1.2.1.2 Vaciado en placa.** Una pequeña cantidad de muestra se mezcla con agar fundido a una temperatura de alrededor de 45 °C y finalmente se vierte dentro de las cajas petri estériles. El resultado es la formación de colonias esparcidas a lo largo del medio y justo en la superficie, donde se pueden cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC).<sup>2, 11</sup>

**1.2.1.3 Dilución.** Esta técnica es ampliamente usada para obtener cultivos puros de muchos tipos de microorganismos. El proceso es llevado a cabo por la dispersión uniforme de la muestra en caldo o solución Ringer utilizando un mezclador, homogenizador o agitación vigorosa. La mezcla resultante es consecutivamente diluida con caldo a tal punto que una porción debe producir un número de colonias en cada placa que son fáciles de separar y de contar. Un punto importante en este método es que solamente se puede utilizar para aislar el tipo de microorganismo predominante en una población mixta.<sup>2, 6</sup>

**1.2.1.4 Cultivo enriquecido.** Esta técnica es un proceso por el cual se establece un ambiente especial que permite la selección del microorganismo deseado, esto se logra partiendo de condiciones que permitan al microorganismo crecer más que otros microorganismos presentes, inhibiendo el crecimiento de todos los demás microorganismos.<sup>2</sup>

### 1.3 Problemas en el mantenimiento estable de los microorganismos

La experiencia de los microbiólogos en el manejo de los cultivos, muestra que ciertos pasos deben ser tomados en cuenta cuando un microorganismo es aislado para que aseguren permanecer en un estado estable. Aunque el cultivo aparente ser el género, se tiene que examinar microscópicamente para determinar si el cultivo está creciendo uniformemente y libre de otros microorganismos.<sup>8</sup>

Si el cultivo es impuro deben usarse métodos para librar al cultivo de sus contaminantes utilizando diluciones o escogiendo una colonia aislada. Para la conservación de estos cultivos frecuentemente se pueden utilizar dos métodos diferentes, por ejemplo, se hacen transferencias periódicas en agar inclinado y al mismo tiempo un método a largo plazo, como la liofilización o la crioconservación.<sup>8</sup>

Para que un cultivo de microorganismos obtenga un crecimiento vigoroso, saludable y estable, los cultivos son inducidos para crecer rápidamente por un tiempo corto de incubación cerca de su temperatura óptima de crecimiento y si estos son aerobios se le permitir el libre acceso de aire.<sup>8</sup>

#### 1.3.1 Problemas de degeneración y pérdida de cepas

La pureza de un cultivo debe asegurar que los subcultivos sean seleccionados a partir de colonias aisladas para formar un nuevo cultivo, esto evitará el riesgo de seleccionar una colonia mutante de un cultivo original. Ciertas especies de bacterias exhiben variación en la morfología colonial a tal grado que se les considera mutación del cultivo original, tales cultivos pueden requerir de muchas resiembras para establecer que en estas variaciones son permanentes. El fenómeno más notable en estas colonias es la presencia de pigmento, presente desde la resiembra de las colonias.<sup>12</sup>

Tomando las experiencias en el laboratorio que involucran la pérdida de cultivos, existen cinco causas que son predominantes: la contaminación por otros microorganismos, la infestación por ácaros, las infestaciones por fagos, la mutación, y el manejo por personal inexperto.<sup>8</sup>

**1.3.1.1 Contaminación por otros microorganismos.** Al momento de inocular muchos cultivos supuestamente puros nunca se obtiene un segundo cultivo, esto ya que a menudo las colonias que crecen en la superficie del agar aparentan estar muy bien aisladas y puras, pero ocultan un segundo microorganismo que tiene un crecimiento escaso, tiende a propagarse en todo el cultivo llevando a la contaminación y pérdida de la cepa original.<sup>8</sup>

**1.3.1.2 Infestación por ácaros.** Estos ácaros son extremadamente pequeños y pueden ser raramente vistos a simple vista. Ellos transportan varias esporas de hongos y parecen ser atraídos por el olor de ciertas especies de hongos. Aunque los tapones de algodón son una buena barrera a las esporas de los hongos, los ácaros cruzan el tapón de algodón de los cultivos puros. Si la infestación se extiende, los cultivos son contaminados y pueden perderse, además muchos cultivos que aparentan estar puros pueden contener ácaros y la contaminación llega a ocurrir.<sup>8</sup>

**1.3.1.3 Infestaciones por fagos.** Por lo común, se hacen distinciones entre virus relacionados con eucariontes y aquellos que infectan procariontes; estos últimos virus se denominan bacteriofagos.<sup>6</sup>

Los virus son capaces de sobrevivir, pero no de proliferar, en ausencia de un célula huésped, para una propagación exitosa se requiere de una forma estable del virus que permita sobrevivir en ausencia de su huésped, unido a un mecanismo para invadir células, además de la información genética necesaria para la replicación de componentes virales dentro de la célula, información adicional para el empaquetamiento de los componente virales y la liberación de los virus.<sup>6</sup>

Los fagos pueden distinguirse con base en su modo de propagación. Los fagos líticos producen numerosas copias de sí mismos y al hacerlo destruye a la célula huésped. Los fagos moderados tienen la propiedad de entrar a un estado no lítico de profago, en el que la replicación de su ácido nucleico esta enlazada a la replicación del ADN de la célula huésped. Generalmente éstos son difíciles de descubrir y es aún más difícil de librar al cultivo de la infestación del fago.<sup>6, 8</sup>

**1.3.1.4 Mutación.** Se puede definir como el cambio del ADN, más precisamente como el cambio hereditario en la secuencia de los nucleótidos, esto por el paso evolutivo en los microorganismos y por alteraciones que producen diferentes cepas. Las mutaciones pueden ser sustituciones, supresiones, inserciones y reordenamiento de las bases.<sup>6, 13</sup>

La frecuencia de mutación se amplifica de modo notable por exposición de las células a mutágenos, un ejemplo, la luz ultravioleta (UV) es un mutágeno físico que lesiona el ADN y durante la reparación de este daño genético, pueden introducirse errores en la secuencia. Los mutágenos químicos pueden actuar por la alteración de la estructura física o química de las bases del ADN, por otra parte las mutaciones por desplazamiento del orden, introducción o supresión de un solo par de las bases del ADN, son causadas por un deslizamiento ligero en las cadenas de ADN. Cuando los cambios en la población genética llegan a ocurrir en los cultivos, es imposible recobrar la forma original.<sup>6, 8</sup>

**1.3.1.5 Personal inexperto.** Probablemente esta causa es la más seria, a menudo los medios son esterilizados inadecuadamente, ya que algunos medios requieren diferente temperatura que otros. Otra causa importante es la transferencia continua del cultivo en donde se aumenta el riesgo de contaminación, esto por el descuido del personal que a menudo transfieren a los cultivos esporas que llegan estar suspendidas en el aire. Además algunos microbiólogos no identifican o etiquetan los cultivos con los que están trabajando por lo que obtienen malos resultados, ya que no utilizan el microorganismo adecuado.<sup>8</sup>

### **1.3.2 Condiciones físicas que afectan el crecimiento de los microorganismos.**

Un medio de cultivo adecuado debe de contener todos los nutrientes requeridos por el microorganismo, y de factores tales como pH, temperatura, humedad, presión osmótica y aeración, que deben de ser controlados minuciosamente ya que pueden llegar a afectar el crecimiento y la longevidad de los microorganismos.<sup>6</sup>

La mayor parte de los microorganismos tienen un rango muy estrecho de pH. Casi todos los microorganismos (neutrófilos) crecen mejor en un pH de 6 a 8, aunque

hay algunos (acidófilos) que tienen un pH óptimo tan bajo como 3 y otros (alcalófilos) tan alto como 10.5.<sup>6, 14</sup>

Diferentes especies microbianas varían ampliamente en sus fluctuaciones de temperatura óptima para su desarrollo: las formas psicrófilas crecen mejor a temperaturas bajas (15 a 20 °C); las formas mesófilas lo hacen mejor de 30 a 37 °C y la mayor parte de las termófilas de 50 a 60 °C. La mayor parte de los microorganismos son mesófilos; 30 °C es la temperatura óptima para muchas de las formas de vida libre.<sup>6, 14</sup>

La importancia del oxígeno en los microorganismos es variable, muchos microorganismos son aerobios obligados, así la respiración puede definirse como un proceso de oxido-reducción en el que los donadores de electrones son compuestos orgánicos o inorgánicos reducidos, y el oxígeno molecular es el aceptor terminal de electrones, además, debido al elevado potencial de reducción del oxígeno, la cantidad máxima de energía disponible se libera a partir de una fuente de energía cuando el oxígeno es el aceptor de electrones, otros son facultativos capaces de vivir aerobia y anaerobiamente; por último los anaerobios obligados en las que el aceptor final de electrones es un compuesto inorgánico distinto al oxígeno. Los compuestos que pueden actuar así son sulfatos, nitratos y carbonatos.<sup>15, 16</sup>

En menor grado, puede ser necesario controlar factores como la presión osmótica y la concentración salina. Para casi todos los microorganismos, son satisfactorias las propiedades de los medios ordinarios; pero dichos factores deben considerarse, por ejemplo, los microorganismos que requieren de altas concentraciones salinas se denominan halófilos; aquellos que requieren presiones osmóticas altas llevan el nombre de osmófilos.<sup>6</sup>

Todos los organismos necesitan agua para vivir. La cantidad del agua varía en los diferentes ambientes, sin embargo, la disponibilidad del agua no depende solamente del contenido del agua, sino que es una función compleja de factores de adsorción y dilución. La mayoría de los microorganismos crecen en medios con gran humedad, pero cuando un microorganismo crece en un medio con actividad baja del agua este debe

realizar más trabajo para extraer agua de la solución. Esto suele dar por resultado un menor rendimiento de crecimiento o una velocidad de crecimiento muy baja.<sup>17</sup>

Un proceso exitoso requiere de la investigación y desarrollo de métodos de conservación con las siguientes demandas: el mantenimiento de la estabilidad en la producción del cultivo y el mantenimiento de las condiciones estables.<sup>18</sup>

### 1.4 Conservación y mantenimiento de cepas

Hay dos objetivos distintos en la conservación de los microorganismos: mantenimiento y conservación. Algunas veces la conservación de cultivos es solo una continuación del proceso de mantenimiento.<sup>7</sup>

El mantenimiento es esencialmente el soporte del cultivo y la conservación es la viabilidad, la pureza, y el crecimiento típico, la conservación tiene la connotación del mantenimiento del cultivo en períodos largos, pero están propensos a la variación de sus características.<sup>7</sup>

Las cepas pueden ser preservadas de varias maneras dependiendo del tipo de microorganismo, las más usadas son el almacenamiento a bajas temperaturas en refrigeradores. Las temperaturas más usuales son a 5 °C y en algunos casos las cepas son mantenidas a -20 °C, con muchos cultivos esta temperatura de conservación funcionan por varios meses, para su posterior reactivación.<sup>18</sup>

Una vez que se obtuvieron cepas con propiedades o características metabólicas definidas queda por resolver la manera de conservarlas con el menor esfuerzo posible. Según sea la especie del microorganismo, se utilizan diferentes métodos de conservación, por lo que se recomiendan los siguientes procedimientos de conservación: liofilización y congelación.<sup>18</sup>

Para la conservación adecuada de una cepa se requiere que el cultivo se mantenga dentro de las condiciones óptimas de crecimiento, guardando al cultivo en el tiempo y en las condiciones establecidas por el método de conservación elegido, esto

nos asegurará la estabilidad y la pureza del cultivo; en otras palabras, bajo estas condiciones se minimiza la aparición de mutaciones y de organismos contaminantes.<sup>18</sup>

#### **1.4.1 Mantenimiento de los cultivos**

**1.4.1.1 Medio inclinado y caldo de cultivo.** El uso de estos medios para el mantenimiento primario de cultivos stock son probablemente los métodos más disponibles. La mayoría de los microorganismos que han crecido en agar inclinado o en caldo pueden conservarse por refrigeración, usualmente por pocos meses. Sin embargo, el uso de estos medios presenta algunas limitaciones ya que incrementa más la oportunidad de contaminación y la indeseable mutación. Las bacterias, pueden perder algunas de las propiedades deseadas como la virulencia, antigenicidad y la habilidad de producir un metabolito particular.<sup>2</sup>

**1.4.1.2 Capa de aceite superficial.** Es un método particularmente usado en el mantenimiento de hongos en donde el aceite mineral es usado en la superficie del agar inclinado. A menudo el intervalo puede alargarse previniendo la deshidratación por evaporación, retarda el intercambio de gas, y permite la transferencia del microorganismo sin destrucción del cultivo. Pero presenta problemas similares a los del agar inclinado, como las pérdidas de esporulación y la pérdida de la actividad bioquímica.<sup>2</sup>

**1.4.1.3 Tierra.** En este método de conservación se utiliza tierra estéril seca, los organismos maduros deben ponerse entonces en la tierra estéril y la preparación resultante puede ser secada en aire o bajo vacío. Es utilizada estrictamente como un portador o como un medio de crecimiento, se emplea exitosamente para una variedad de microorganismos incluyendo hongos y bacterias.<sup>2</sup>

Para muchos hongos, el mantenimiento en tierra es muy utilizado. La tierra húmeda puede ser inoculada y permite que la esporulación sea completada.<sup>2</sup>

### 1.4.2 Almacenamiento y conservación de bacterias

En la mayoría de las colecciones de cultivos modernas se efectúa la liofilización o la crioconservación como métodos de conservación, principalmente en las bacterias, esporas o porciones de micelio de los hongos, son suspendidas con un crioprotector, como glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros, estos métodos ayudan a mantener libres de contaminación, cambios en la presión, pH y humedad de las colecciones de cultivo.<sup>5,8</sup>

**1.4.2.1 Transferencia periódica.** Es uno de los más viejos y más tradicionales métodos para preservar cultivos bacterianos. Los microorganismos tienden a ser desarrollados en un medio óptimo y lo principal es hacer subcultivos frecuentemente con el objeto de mantener al cultivo vivo y detener el crecimiento tan pronto como sea posible en la fase logarítmica, evitando así la aparición de mutantes y la posible selección de estos.<sup>4,5</sup>

Es difícil mantener cultivos de algunos organismos muy exigentes. Algunas especies requieren trasladarse después de días o semanas, considerando que otros pueden ser transferidos después de varios meses o años. La transferencia periódica tiene muchas desventajas, las más notables son los cambios de sus características (físicas y químicas), contaminación, una inoculación con organismos extraños lo que llevaría a una pérdida del cultivo.<sup>19</sup>

**1.4.2.2 Reducción del metabolismo.** Con frecuencia el metabolismo de los subcultivos puede ser reducido usando medios con una concentración mínima de nutrientes, cubriéndolos con aceite mineral y almacenándolos a bajas temperaturas. Las bacterias suelen sobrevivir por años en estas condiciones.<sup>19</sup>

**1.4.2.3 Secado.** Este método tiene su uso para la conservación de muchos tipos de microorganismos; algunos resisten el proceso y otros no. Células o esporas pueden ser aplicadas con asa, en papel o mezcladas con gelatina, para después secarlas en un desecador con o sin vacío. Las células conservadas por estos métodos pueden sobrevivir varios meses de almacenamiento y es recomendado para el transporte de microorganismos.<sup>4</sup>

**1.4.2.4 Liofilización.** Este procedimiento evita muchas de las desventajas asociadas con el procedimiento de transferencia periódica. En la liofilización el material se congela para convertir el agua en hielo, el hielo formado después de congelar es removido por la conversión del sólido a la forma de vapor, el material del liofilizado se guarda entonces en ampollitas selladas a vacío. Antes de su utilización, las muestras pueden reactivarse abriendo las ampollitas y adicionando agua estéril. Las bacterias y levaduras son bastante tolerantes a la liofilización y por consiguiente en estas células puede llevarse a cabo este método.<sup>5, 19</sup>

**1.4.2.5 Crioconservación.** Este método radica en la congelación y almacenamiento de células a temperaturas muy bajas. El congelamiento provoca muchos cambios en las células que le son perjudiciales, estos incluyen la formación de cristales de hielo, deshidratación, incremento en la concentración de electrolitos, coloides, sales, carbohidratos, lípidos y proteínas, disminución de pH, cambios en conductividad eléctrica y calórica, disminución en la actividad de algunas enzimas, incremento en la actividad de las enzimas, acumulación de metabolitos intermediarios, concentración eutéctica en las soluciones, solidificación e inmovilización de todas las moléculas.<sup>19, 20</sup>

Las suspensiones de las células son enfriadas, el agua líquida alrededor de las células empiezan a formar hielo, resultando un incremento en la concentración de solutos fuera de las células, esto porque hay una diferencia en la presión osmótica del agua en la célula, que produce un desequilibrio en la concentración de las sales restantes.<sup>19</sup>

Las células bacterianas pueden ser crioconservadas debido a su organización celular y a su capacidad de supervivencia. La mayoría de las bacterias que son aisladas pueden permanecer congeladas fácilmente a -80 °C, aunque esto depende de la composición de la suspensión celular, es decir del caldo de cultivo, la concentración inicial del microorganismo y del tipo de crioprotector, que llegan a ser determinantes en la viabilidad bacteriana y en sus capacidades de reactivación. Después del almacenamiento, es recomendado una descongelación y un traslado rápido de las bacterias a un medio de crecimiento apropiado.<sup>21, 5</sup>

**1.4.2.6 Congelación.** Este método es una variación de conservación en nitrógeno líquido, por ejemplo, los crioprotectores son añadidos para proteger los posibles daños celulares con un rango de enfriamiento inferior a -20 °C; debido a que las temperaturas bajas al borde de la congelación (0 a -20 °C) detienen el metabolismo microbiano y mantienen a los microorganismos vivos, en un estado inactivo metabólicamente, recuperando su actividad metabólica después de la descongelación.<sup>4,22</sup>

Éstos son los métodos principales para conservar cultivos y todos estos tienen éxito en la reducción del daño celular y en la viabilidad de los cultivos por las condiciones físicas hostiles.<sup>8</sup>

Es impráctico mantener cultivos celulares indefinidamente cuando estos pueden sufrir cambios genéticos en la transferencia periódica y poner en riesgo sus características diferenciales. Así las técnicas de congelación y liofilización tienden a ser métodos estandarizados por un período largo manteniendo los cultivos de bacterias. Ambos métodos de conservación proveen variación exitosa de diferentes especies de bacterias, y ninguna técnica resulta en un 100% de recuperación de las células conservadas.<sup>23, 24</sup>

## 1.5 Los principios de congelación

Cuando hay necesidad de almacenar por un período largo, es necesario reducir la actividad metabólica de células microbianas hasta un punto en que se detiene la reproducción. La actividad bioquímica de las células puede ser reducida a un estado de “actividad suspendida”, disminuyendo la temperatura hasta la máxima eliminación del agua. Las células deben ser crioconservadas cuando la fase exponencial de crecimiento aumente y las oportunidades de recuperación sean buenas.<sup>2, 23</sup>

Los métodos pueden ser ampliamente clasificados acorde a la temperatura de almacenamiento, las temperaturas de -20 a -30 °C son logrados por congeladores estándar en laboratorios, a -70 °C con ultra-baja temperatura de congelación y de -140 a -196 °C con nitrógeno líquido. La viabilidad celular es casi independiente del período de almacenamiento, y se cree que los sistemas biológicos son genéticamente estables.<sup>24</sup>

Muchos laboratorios almacenan bacterias por congelación en nitrógeno líquido y utilizan agentes crioprotectores como glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Los microorganismos pueden ser preservados desde -5 a -20 °C por 1 a 2 años en congelación en caldos de cultivos o suspensión celular.<sup>25,26</sup>

La razón científica de usar temperaturas extremadamente bajas es que por debajo de -139 °C para el agua y debajo de -130 °C para los medios de cultivo, las moléculas no se mueven, no hay reacciones químicas y se reduce el daño celular, ocurrido durante los procedimientos de congelación. De hecho, una de las desventajas consiste en el daño severo de las células expuestas a congelación, ocasionadas por la formación de hielo intracelular, el agua fuera de la célula y del aumento en la concentración de sales en la solución intracelular, otras desventajas de la crioconservación son los altos costos del equipo y de los reactivos, y en el caso de nitrógeno líquido, la necesidad de un suministro constante, cualquier interrupción en el flujo del nitrógeno puede llevar a la pérdida de las muestras guardadas.<sup>5</sup>

### 1.5.1 Los agentes crioprotectores

La congelación y descongelación constituye una técnica conocida para el rompimiento celular y es por que el agua es removida durante el congelamiento en forma de hielo, los electrolitos llegan a incrementar la concentración en el agua descongelada y esto llega a ser perjudicial. Esto ya que la concentración electrolítica fuera de las células llega a ser muy diferente a la de adentro, llevándolas a la presión osmótica alta. Es por esto que se agregan agentes crioprotectores durante el crecimiento del microorganismo o antes de congelar. El tipo de protector depende mucho del microorganismo; sin embargo, hay algunos que parecen trabajar bien con muchas especies. Generalmente, los agentes protectores pueden clasificarse en dos categorías: cristales amorfos formados, y cristales de sales eutécticas.<sup>12, 27, 28</sup>

La formación de un estado cristalino aumenta la viscosidad dentro y alrededor de la célula para mantener al mínimo la movilidad molecular. El cristal amorfo inerte también puede retener productos que son desechados por las células dentro de la estructura, esto significa que estos no salen para iniciar los cambios electroquímicos irreversibles en la membrana del plasma durante el almacenamiento.<sup>27</sup>

Existen compuestos que permiten que las células sobrevivan a la congelación (solidificación), aunque con una variedad de mecanismos. Por lo tanto los crioprotectores, no actúan sobre un receptor específico, enzima o gen. Estos agentes están conformados por alcoholes (incluyendo glicoles), aminas (incluyendo amidas), azúcares, sales inorgánicas, y macromoléculas (incluyendo proteínas y polisacáridos); ejemplos específicos están mencionados en el cuadro 2.<sup>28,29</sup>

Cuadro 2. Ejemplos de crioprotectores.<sup>29</sup>

|   |
|---|
| Alcoholes<br>Adonitol<br>Etilenglicol: etanediol<br>Glicerol<br>Metanol<br>Propileglicol: 1, 2-propanediol<br>Sorbitol                                    |
| Aminas<br>Acetamida<br>Betaina<br>Formamida<br>Glutamina<br>Lisina<br>Taurina   |
| Sales inorgánicas<br>Sulfato de amonio<br>Sulfato de magnesio<br>Acetato de sodio   |
| Macromoléculas<br>Suero de albumina<br>Glicopéptido anticongelante<br>Dextran<br>Fosfolípido de yema de huevo<br>Polietilenglicol<br>Polivinilpitrolidona |
| Azúcares<br>Glucosa<br>Lactosa<br>Maltosa<br>Sucrosa<br>Trehalosa   |
| * Dimetilsulfóxido (DMSO) es uno de los más importantes crioprotectores, que no pertenece a ninguna de estas clases                                       |

Los agentes crioprotectores modifican la tonicidad de las células haciendo posible el que las velocidades de enfriamiento sean lentas, de esta manera se minimiza

la congelación intracelular. Los crioprotectores pertenecen a dos tipos principales, definidas por las bases de su permeabilidad a la célula: <sup>11, 30</sup>

**1.5.1.1 Agentes penetrantes.** Los cuales a concentraciones altas protegen las células contra el daño de una congelación lenta, causado por los cristales del hielo intracelulares y de los efectos osmóticos. Son de bajo peso molecular y generalmente son aplicados a altas concentraciones, entre estos se encuentra el DMSO, glicerol, etanol, metanol, acetato de amonio, tritilaminoacetato y etilenglicol. <sup>10, 27</sup>

El mecanismo por el cual un agente protector penetra previniendo el daño celular es debido a sus propiedades coligativas de formar puentes de hidrógeno y esto indica la capacidad del agente protector para ligar o sustituir el agua. Los factores que se deben considerar para que un agente crioprotector sea conveniente son: baja toxicidad, alta solubilidad en agua y capacidad de enlace con ella, además de su facilidad de penetración en las membranas celulares. <sup>11, 30, 31</sup>

**1.5.1.2 Agentes no penetrantes.** Son utilizados a bajas concentraciones ya que pueden producir toxicidad a altas concentraciones y llegar a causar serios problemas, protegen a las células del daño provocado por los cristales de hielo extracelular, generalmente requieren de una mayor rapidez de enfriamiento, entre estos se encuentran los compuestos de macromoléculas como la polivinilpolividona, algunos azúcares como manitol, sorbitol y polímeros de almidón. <sup>11, 30, 31</sup>

El mecanismo por el cual otorga la protección no ha sido establecido, pero se ha propuesto uno a nivel extracelular en donde la presencia de estos agentes altera la permeabilidad de la membrana produciendo una salida irreversible de solutos que ocurre bajo la presencia de un cambio osmótico. El cambio hipertónico es disminuido durante el congelamiento por la entrada de solutos extracelulares y la lisis hipotónica es impedida durante el descongelamiento por la salida de solutos. <sup>11, 23, 30</sup>

Todas estas sustancias tienen una alta afinidad por el agua y son solubles incluso a bajas temperaturas, esto pueden relacionarse a sus efectos protectores. Los mecanismos propuestos en los efectos de la cristalización del agua son que disminuyen

el punto de congelación, aumentando la permeabilidad de la membrana y la estabilización de la estructura celular. Además de proteger a las células contra los daños causados por el agua intracelular, previenen la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular excesiva reduciendo la concentración intracelular de sales. Los criopreservantes no-permeables (los polisacáridos, las proteínas) son particularmente convenientes para los microorganismos, porque se adsorben en la superficie microbiana y forman una capa viscosa muy eficaz la cual protege a la pared celular y a la membrana microbiana.<sup>12,5</sup>

El rango de enfriamiento de la muestra juega un papel importante en la conservación celular después de la congelación, generalmente un rango de enfriamiento lento, en el orden de 5-10 °C/min, no permite la cristalización intracelular y los resultados en la viabilidad celular son altos después del almacenamiento.<sup>19</sup>

## 1.6 Congelación

Si se tiene un sistema acuoso relativamente rico en agua congelable, como es el caso de los sistemas biológicos, que son soluciones que contienen sales minerales, sustancias orgánicas o un sistema celular y si este sistema se somete a un enfriamiento progresivo, se comienza a formar hielo a una temperatura ligeramente inferior a 0 °C. La cristalización del hielo provoca una concentración de la fase líquida restante y el avance de la solidificación del agua estará ligado a un descenso de temperatura del sistema. En este período de enfriamiento, el producto contiene cristales de hielo que nadan en una fase líquida cada vez más concentrada que es llamada “*solución intersticial*”, esta posteriormente se solidificara. Llevando el sistema acuoso a una temperatura por debajo del punto eutéctico se consigue que toda la suspensión se congele.<sup>32</sup>

### 1.6.1 Velocidad de congelación

El factor inicial en un proceso de criopreservación es la velocidad de enfriamiento, por lo que se sugiere al inicio de la congelación un descenso térmico controlado. Los métodos de congelación se dividen en:<sup>30</sup>

**1.6.1.1 Congelación lenta:** es el método más común y consiste en bajar la temperatura gradualmente, esto provoca un flujo de agua intracelular hacia el exterior en donde se congela y forman un menor número de cristales de hielo. De manera similar las tasas de enfriamiento que se manejan están entre 0.5 y 0.2 °C/min., sin embargo se ha reportado tasas del orden de 0.1 a 10 °C/min.<sup>30</sup>

**1.6.1.2. Congelación rápida:** consiste en la inmersión directa de las células en nitrógeno líquido o directo al congelador, este método provoca la formación de un gran número de cristales de hielo que se distribuyen con uniformidad.<sup>30</sup>

**1.6.1.3. Congelación por pasos:** este método consiste en congelar las células en etapas y temperaturas predeterminadas. Cuando la muestra alcanza una temperatura entre los -35 a -40 °C y el agua de la célula ha salido para convertirse en hielo externo se transfieren directamente a nitrógeno líquido.<sup>30</sup>

Si la velocidad de congelación es lo suficientemente lenta, la pérdida progresiva de agua deshidratará a la célula pero esta no se congelará, pero si el descenso de temperatura continúa, la deshidratación excesiva dañará la membrana celular por un mecanismo en donde la deshidratación y la reducción del volumen celular son críticas. Si por el contrario, la velocidad de congelación es rápida, se evitará la salida de agua del interior de la célula al medio extracelular, pero su interior se enfriará lo suficiente para provocar que la formación de hielo sea muy elevada y consecuentemente se producirá la destrucción de las estructuras internas y de la membrana celular por estos cambios.<sup>30</sup>

El método en el que se ha obtenido mayor viabilidad celular cuando se ha llevado en forma controlada ha sido el de enfriamiento lento con la desventaja que se requiere de un complejo y costoso proceso. También se han tenido buenos resultados sin utilizar una temperatura controlada, resultando un proceso más simple en el que se abaten costos y se pueden almacenar en congelador.<sup>30</sup>

## **1.6.2 Congelación en los sistemas celulares**

Los fenómenos de congelación son esencialmente los mismos en un tejido, suspensión celular o solución: después de una primera etapa de separación de hielo, se

produce la solidificación de soluciones intersticiales concentradas. La repartición del hielo según una forma inicial más o menos fina dependerá de la velocidad de enfriamiento y de la composición química. Un problema específico es la localización del hielo al interior o exterior de las células, lo que se puede decir que un enfriamiento lento origina, la cristalización del hielo sólo en el exterior de las células, la separación del hielo determina una concentración del medio por lo que las células se deshidratan y un enfriamiento rápido produce una cristalización simultánea de líquidos intracelulares y pericelulares. Después puede continuar la cristalización extracelular sola o la intracelular, según la velocidad a la que se extraiga el agua de las células.<sup>33</sup>

### **1.6.3 Congelación eutéctica**

En algunos sistemas simples o en ciertas sustancias de bajo peso molecular, la congelación es de tipo eutéctico. Esto significa que al llegar a una temperatura y concentración determinadas, la fase intersticial se solidifica a temperatura constante en una mezcla de cristales finos de hielo y soluto que son hidratados. Las sales eutécticas parecen ejercer sólo efectos perjudiciales en lugar de proteger los sistemas.<sup>27, 33</sup>

Una sal eutéctica es una sal cristalizada que deja las estructuras del cristal en la solución, cada soluto cristalizará a una temperatura diferente. La formación de cristales, sales o hielo podrían dañar la membrana celular potencialmente, esto cuando el punto de congelación se alcanza, los cristales de hielo se forman, y las sales restantes salen a la solución que se concentrará alrededor de los cristales de hielo. Esta solución concentrada se mezcla con cualquier sustancia liberada por las células y esto causa un daño irreversible a la membrana celular.<sup>23</sup>

Una descongelación rápida del cultivo es recomendado, la fusión comienza a temperatura eutéctica en donde el calentamiento permanece constante al tiempo que dure la fusión de esta fase, para seguir por la fusión del hielo intracelular a medida que la temperatura se eleva.<sup>26</sup>

### **1.6.4 Daño celular, criolesión**

La criolesión o daño celular por la congelación es provocado principalmente por dos factores, las bajas temperaturas y cristalización del agua. Una reducción de la

temperatura celular provoca cambios no uniformes en las reacciones bioquímicas. Un ejemplo muy conocido es el daño que recibe el intercambio iónico responsable del mantenimiento electrolítico cuando se reduce la temperatura.<sup>29</sup>

La cristalización del agua tiene grandes consecuencias para las células que se congelan. El enfoque de la *cristalización* es importante, sin confundirse con otros mecanismos de solidificación del agua como la *vitrificación*. La cristalización es un proceso en el cual moléculas como el agua son organizadas como una sustancia pura, ideal sin inclusiones, en un arreglo cristalino. Congelación de una solución acuosa que comprende la separación de sus componentes químicos dentro de cristales en la temperatura eutéctica. En contraste, la vitrificación de una solución acuosa involucra la solidificación sin cristalización.<sup>29, 34</sup>

La cristalización puede ocurrir completamente en el sistema celular con hielo en los espacios intracelular y extracelular, o esto puede estar restringido para el espacio extracelular. La cristalización intracelular usualmente provoca un rompimiento de la ultraestructura celular. La cristalización reducida a espacios extracelular resulta en una deshidratación, las células tienden a encogerse; esto ya que el agua líquida intracelular se convierte en cristales extracelulares. La pérdida del volumen celular y la distorsión concomitante de la membrana celular puede ser perjudicial durante la congelación.<sup>29</sup>

Los crioprotectores pueden limitar la cristalización por un gran número de mecanismos que actúan solos o en conjunto. Se sabe que la supervivencia celular se aumenta cuando los crioprotectores reducen cuantitativamente la formación de hielo, mantiene el volumen celular y el límite de desnaturalización macromolecular. La reducción del hielo intracelular puede realizarse por dos formas relacionadas a sus propiedades coligativas del agua, presión osmótica y depresión del punto de congelación.<sup>29</sup>

Los crioprotectores reducen la formación intracelular por deshidratación osmótica celular, reduce la cantidad disponible de agua intracelular por congelación. Los crioprotectores son osmoticamente activos, algunos mas que otros; la permeabilidad celular del crioprotector es menor que la del agua. Así es que, incluso los agentes

permeables tal como DMSO y el glicerol tienen potencial osmótico, que aumenta cuando la actividad cinética del crioprotector disminuye con las bajas temperaturas (10 a -10 ° C).<sup>29</sup>

### **1.7 Cuantificación de la viabilidad celular**

En la congelación se determina el número de células viables para demostrar la eficacia del método. Para los microorganismos que puedan crecer en medio sólido, los números celulares son cuantificados realizando diluciones en serie y sembrándolas en un medio apropiado para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Las placas se incuban a la temperatura y tiempo apropiado en que se puedan contar las colonias. La viabilidad de organismos que no puedan sembrarse, son determinados por número más probable (NMP) usando tubos de ensaye. Las cuentas celulares viables antes de congelar y después de congelar se comparan para calcular el porcentaje de supervivencia.<sup>32, 35</sup>

### **1.8 Antecedentes de los microorganismos de estudio**

#### **1.8.1 Enterobacterias**

La familia Enterobacteriaceae esta compuesta por un gran número de especies estrechamente relacionadas y que se encuentran en el suelo, el agua, la materia de descomposición y en intestino grueso de humanos, animales e insectos. Debido a su hábitat natural en los seres humanos, estos microorganismos reciben el nombre de “bacilos entéricos”. Dentro de esta familia se encuentran algunos de los agentes causales de enfermedades gastrointestinales, pero la mayor parte de estos son microorganismos oportunistas que pueden infectar cualquier sitio del organismo cuando encuentran un huésped alterado. Los bacilos entéricos son responsables de la mayor parte de las infecciones nosocomiales, la gravedad de este problema se complica por el hecho de que muchos microorganismos son resistentes a múltiples agentes antimicrobianos.<sup>36</sup>

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos pequeños que no forman esporas. Pueden ser móviles o inmóviles, cuando son móviles la locomoción se realiza por medio de flagelos peritricos.<sup>36</sup>

Los bacilos entéricos pueden poseer una capsula bien definida, como se ve en el caso del género *Klebsiella* o una cubierta laxa, y mal definida conocida como cubierta mucosa, o bien de carecer de cualquiera de estas estructuras. Las fimbrias o pili están presentes en casi todas las especies y son responsables de la fijación de las células bacterianas a otras bacterias, a las células huésped y a los bacteriófagos.<sup>36</sup>

**1.8.1.1 Género *Enterobacter*.** Bacilos rectos, 0.6-1.0 µm de ancho x 1.2-3.0 µm de largo, gramnegativa, móvil por flagelos peritricos (*excepto E. asburiae*). Anaerobio facultativo, tiene ambos tipos de metabolismo, respiración y fermentación. La temperatura de crecimiento óptima es de 30 a 37 °C. D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. La prueba de indol resulta negativa. Muchas cepas son Voges-Proskauer y citrato de Simmons positivo, varía con la prueba rojo de metilo, prueba lisina negativa (*excepto E. gergoviae*) y ornitina positiva (*excepto E. agglomerans*). La gelatina es ligeramente licuada (3-14 días) por muchas cepas, no son producidos H<sub>2</sub>S, desoxiribonucleasa, y lipasa. Carbohidratos fermentados por todas o la mayoría de las cepas incluye L-arabinosa, celulosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina y trehalosa. Debido a que muchas cepas del género *Enterobacter* producen grandes cantidades de gas por muchos años la especie fue denominada *Aerobacter*. La designación del género fue cambiada en 1962 por Edgard y Ewing.<sup>37, 38</sup>

*E. aerogenes* es la especie más comúnmente encontrada en las muestras clínicas. Se encuentran ampliamente distribuidas en el agua, los afluentes cloacales, la tierra y los vegetales. Se asocia con una variedad de infecciones oportunistas las vías urinarias y el tracto respiratorio, las heridas cutáneas y, en ocasiones, causan septicemia y meningitis. Se llega a confundir con *Klebsiella oxytoca* que es ureasa positivo, pero *E. aerogenes* es ureasa negativo.<sup>38, 39</sup>

**1.8.1.2 Género *Escherichia*.** Bacilos rectos, 1.1-1.5 µm x 2.0-6.0 µm, se encuentran solos o en pares, gramnegativas. Cápsulas y microcápsulas aparecen en

muchas cepas. Algunos son móviles por flagelos peritricos, aunque otros no son móviles. Los anaerobios facultativos, tiene ambos tipos de metabolismo, respiración y fermentación. La temperatura de crecimiento óptima es 37 °C. D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Prueba oxidasa con resultado negativo, catalasa positiva, rojo de metilo positivo, Voges-Proskauer negativo y prueba citrato negativo. No presenta H<sub>2</sub>S, hidrólisis de la urea, y lipasa. Las especies de *Escherichia* reducen nitratos y la mayoría de las cepas fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-rhamnosa, D-xylosa y trehalosa. Este microorganismo es la especie mas recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos, es por esto que ha sido objeto de diversas investigaciones científicas.<sup>36, 37, 38</sup>

*E. coli* es una especie móvil, es el principal habitante del intestino grueso y es única entre los microorganismos que integran la flora normal y es natural suponer que su presencia en los alimentos indica reciente contaminación con heces, además es el patógeno humano aislado con mayor frecuencia, causante de las infecciones de las vías urinarias y de las heridas, de neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos, de meningitis en neonatos y de septicemia. Los últimos estudios han demostrado que algunas cepas de *E. coli* también son patógenos intestinales importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales.<sup>36, 39</sup>

**1.8.1.3 Género *Klebsiella*.** Bacilos rectos, 0.3-1.0 µm de diámetro y 0.6-6.0 µm de largo, su arreglo es solo, en pares o en cadenas cortas, gramnegativas. Las células son encapsuladas, no móviles. Anaerobio facultativo, tiene ambos tipos de metabolismo, respiración y fermentación. La temperatura de crecimiento óptima es 37 °C. D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Prueba oxidasa negativa, catalasa positiva. Las pruebas indol, Voges-Proskauer, citrato de Simmons y rojo de metilo suelen variar su reacción dependiendo de la especie. Usualmente lisina descarboxilasa es positiva y ornitina descarboxilasa negativa. Muchas especies hidrolizan la urea, reducen nitratos y tienden a crecer en KCN. El H<sub>2</sub>S no es producido. Este género fue llamado en honor de Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX, están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Debe sospecharse la presencia de especies de *Klebsiella* cuando se recuperan colonias grandes

amarillas de consistencia mucosa de placas de aislamiento. Las *Klebsiellas* tienen una tendencia de alojar plásmidos de resistencia a los antibióticos, y últimamente se han encontrado cepas resistentes a un amplio espectro de drogas  $\beta$ -lactámicas.<sup>37, 38</sup>

*K. oxytoca* es inmóvil se presenta normalmente sobre semillas y plantas y se halla también en el intestino humano y de los animales, pueden producir infecciones urinarias. Se aísla con frecuencia de esputos de pacientes tratados con antibióticos.<sup>39</sup>

**1.8.1.4 Género *Proteus*.** Bacilos rectos, 0.4-0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro x 1.0-3.0  $\mu\text{m}$  de largo, gramnegativa, móvil por flagelos peritricos. Muchas cepas presentan el fenómeno swarm, donde el rasgo característico de alta movilidad se observa como un despliegue del microorganismo en forma de onda a lo largo de toda la superficie del agar cuando crece sobre este. Anaerobio facultativo, tiene ambos tipos de metabolismo, respiración y fermentación. La temperatura de crecimiento óptima es 37 °C. D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Prueba oxidasa negativa, catalasa positiva, rojo de metilo positivo, varían en indol, Voges-Proskauer y citrato de Simmons. Las pruebas lisina descarboxilasa y arginina dehidrolasa presentan resultado negativo; solo *P. mirabilis* es ornitina descarboxilasa positiva. La fenilalanina y triptófano son oxidativamente desaminados, la urea es hidrolizada y reduce nitratos. Crecen en KCN y el H<sub>2</sub>S es usualmente producido. El malonato no es utilizado. Una o mas especies reduce glicerol, maltosa, sucrosa, trehalosa, y D-xilosa. Se encuentra en suelos, agua y material contaminado con materia fecal.<sup>37, 38</sup>

*P. vulgaris* es común encontrarlo en el suelo y vegetación, además en el intestino de los animales. Contamina frecuentemente los alimentos, determinando su alteración y descomposición. Es frecuentemente su hallazgo en infecciones hospitalarias, se aísla con mayor frecuencia en huéspedes inmunosuprimidos, en particular aquellos que reciben tratamientos prolongados con antibióticos.<sup>39</sup>

### **1.8.2 Género *Staphylococcus***

Células esféricas, 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran individualmente, en pares, y en racimos irregulares, células grampositivas, no móviles y sin esporas. Anaerobios facultativos, con ambos tipos de metabolismo respiración y fermentación.

Sus colonias son usualmente opacas y pueden ser blancas o cremosas, algunas veces amarillas o anaranjadas. Prueba catalasa positiva, comúnmente oxidasa negativo. El nitrato es casi siempre reducido a nitrito. Es muy común su crecimiento con 10% de NaCl. La temperatura de crecimiento óptima es 30-37 °C. Los cocos grampositivos fueron descritos por primera vez por Koch (1878), quien reconoció que distintas enfermedades fueron producidas por organismos que difieren sus patrones de crecimiento: en pares, cadenas o racimos. El hábitat natural primario de los estafilococos es la superficie corporal de los mamíferos donde se los encuentran en grandes cantidades. En su adaptación al parasitismo, los estafilococos se encuentran entre las más versátiles y prosperas de las bacterias patógenas. Su agresividad latente se manifiesta solo si la barrera de la superficie se rompe a causa de un traumatismo o por cirugía y los microorganismos ganan acceso a los tejidos subyacentes. Una vez que han invadido el torrente sanguíneo los estafilococos pueden producir endocarditis aguda y lesiones metastáticas diseminadas. Un factor importante en la persistencia del microorganismo a pesar de la introducción de numerosos antibióticos antiestafilocócicos efectivos durante los últimos 40 años es su capacidad para desarrollar resistencia a estos agentes. Ha generado gran preocupación la aparición de cepas resistentes a la penicilina y sus derivados y la asociación de estas cepas con brotes epidémicos de infecciones nosocomiales severas.<sup>36, 37, 40</sup>

*Staphylococcus epidermidis* produce de manera característica colonias blancas en agar sangre. Parece ser específico de huésped para los seres humanos que transportan el organismo como una parte de la flora normal de la piel. Los sitios más frecuentes incluyen axilas, cabeza, brazos y piernas. Por consiguiente el hombre sirve como una fuente exógena de contaminación para la infección de otros, en el huésped normal es un microorganismo de baja virulencia, pero cuando las defensas están bajas puede causar infecciones serias que ponen en riesgo la vida. Las infecciones producidas por *S. epidermidis* que afectan las prótesis es exclusiva y explica su elevada morbilidad, estas incluyen endocarditis de válvulas cardíacas naturales y protésicas, infecciones por catéteres intravenosos, peritonitis asociada con catéteres para diálisis peritoneal, osteomielitis, infecciones de heridas, infecciones de injertos vasculares e infecciones de vías urinarias entre otras. Por lo general los aislamientos de *S. epidermidis* asociados

con hospitales son resistentes a múltiples antibióticos, incluidos la meticilina y penicilina G.<sup>36,38</sup>

### 1.8.3 Género *Streptococcus*

Células esféricas u ovoides, 0.5-2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran en pares o cadenas cuando crecen en medio líquido; algunas veces hay un alargamiento en su forma. Son células grampositivas, no motiles (móviles) y sin esporas. Algunas especies son encapsuladas. Son anaerobios facultativos, requerimiento de un medio rico nutricional para su crecimiento y algunas veces 5% de  $\text{CO}_2$ . Metabolismo fermentativo, produciendo principalmente lactato pero no gas. Catalasa negativa. Comúnmente atacan las células rojas de la sangre, con alguna decoloración verdosa ( $\alpha$ -hemólisis) o completo aclaramiento ( $\beta$ -hemólisis). El crecimiento es limitado a una temperatura de 25-45 °C (óptimo a 37 °C). Fueron descritos por primera vez por Billroth en 1874 en exudados purulentos de lesiones y heridas infectadas. Este género comprende un grupo biológico grande y diverso de cocos grampositivos que proliferan en medios líquidos forman pares o cadenas y el largo de la cadena varía de acuerdo con la especie y con la composición del medio de cultivo. Los estreptococos son anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo. Son catalasa-negativos, una propiedad importante y conveniente para la separación inicial entre estreptococos y estafilococos.<sup>36,37,40,41</sup>

La primera clasificación fue basada en su capacidad de hemolizar el medio agar sangre. En 1919, fueron introducidos los términos alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), y gamma ( $\gamma$ ) que describen los tres tipos de reacciones hemolíticas.<sup>40</sup>

*Streptococcus agalactiae* es generalmente  $\beta$ -hemolítico, pero puede presentar no hemólisis, en algunos casos. Los estreptococos del grupo B habitualmente se encuentran entre la flora de la faringe, el tracto gastrointestinal y la vagina. Cerca de un 15-20% de las mujeres embarazadas pueden ser portadoras vaginales. La incidencia de la enfermedad en los neonatos colonizados es baja pero puede tener consecuencias desastrosas. Pueden producir infecciones cutáneas, endocarditis, infección puerperal, septicemia neonatal y meningitis. El tratamiento de elección para esta cepa es la penicilina G, la mayor parte de las cepas también son sensibles a la citromicina, el cloranfenicol, las cefalosporinas, la vancomicina, el emipenem y la clindamicina.<sup>36,41</sup>

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Alrededor del mundo existen numerosas colecciones de cultivo que usualmente están asociadas con fines docentes, investigaciones especializadas o para disponer de cepas patrón en múltiples procesos industriales. La mayoría de los laboratorios necesitan cultivos de microorganismos que aseguren su calidad, y por lo tanto, que mantengan su viabilidad, estén libres de cualquier contaminación y mantengan sus características fisiológicas. En la actualidad, para la conservación de cultivos microbiológicos se emplean la liofilización y la criopreservación, pero cuando los recursos son escasos para la utilización de estas técnicas se emplean alternativas menos costosas.

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza se imparten licenciaturas, como son Biología, Medicina, Odontología y Química Farmacéutico Biológica, las que emplean en sus prácticas de laboratorio cultivos de microorganismos. Los cultivos son mantenidos por el método de transferencia periódica en agar inclinado y presentan pérdidas por contaminación, degeneración y mutación.

Es por ello que se debe de implementar un método adecuado que asegure el mínimo riesgo de contaminación del cultivo y la viabilidad no decaiga durante la conservación. Además que no sea costoso y que los materiales necesarios para desarrollar el método estén al alcance del laboratorio encargado del mantenimiento y resiembra del cepario, para que los cultivos microbianos estén a disposición de los laboratorios que los requieran en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

### III. HIPÓTESIS

Si se emplea la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  acompañado de un agente crioprotector, glicerol al 10%, se podrá mantener y conservar bacterias con un rango de viabilidad amplio y estable, esto durante un período de conservación de 180 días, en el cual la pureza y la viabilidad no deberán de presentar cambios significativos.

#### IV. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Implementar el método de conservación por congelación a -20°C, utilizando las especies bacterianas: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461, ATCC 12228 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813. Con el fin de determinar la utilidad de este método para aplicarlo al cepario de la FES Zaragoza.

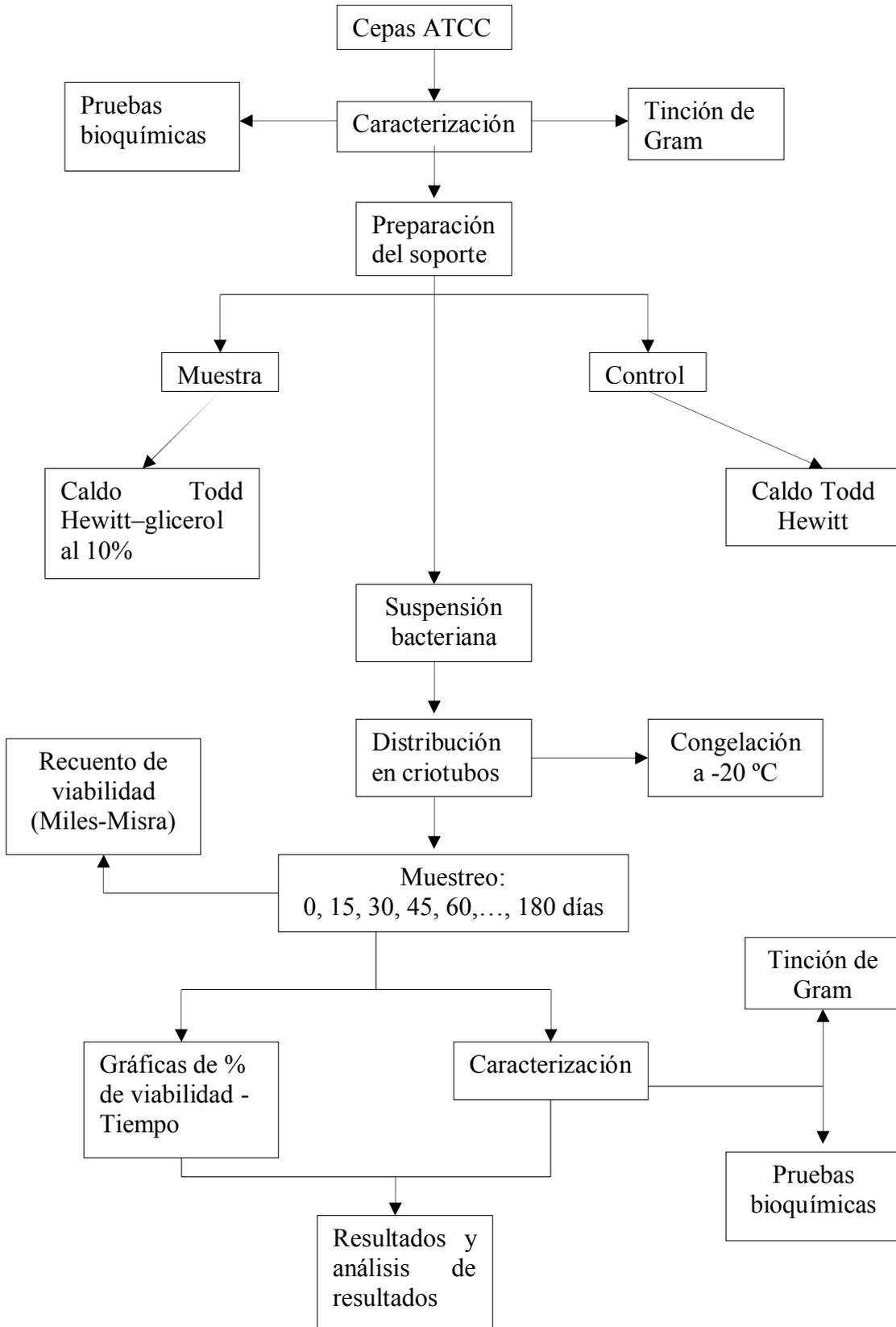
- **Objetivos particulares**

Obtener una técnica específica para la conservación y almacenamiento de otras especies bacterianas que tenga características similares a las cepas estudiadas, de las cuales se encargará el Laboratorio de Producción que realiza el mantenimiento y resiembra del cepario de la FES Zaragoza, y mismo que llevará un control adecuado que asegure la viabilidad y pureza de las bacterias.

Evaluar la pureza y viabilidad de las bacterias en la suspensión caldo Todd Hewitt-glicerol al 10%, durante un período de 180 días.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Diagrama 1. Método general



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material

- Cajas Petri (*Kimax*)
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm(*Kimax*)
- Tubos de ensaye de 18 x 100 mm(*Kimax*)
- Criotubos de 1.8 mL.
- Micropipeta semiautomática de 5 a 50 µL
- Micropipeta semiautomática de 100 µL
- Puntas de plástico para micropipeta
- Matraces Erlenmeyer (*Pyrex*)
- Mecheros
- Gradillas
- Portaobjetos
- Asas bacteriológicas
- Balanza granataría (*OHAUS*)

### 6.2 Material biológico

- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131
- *Proteus vulgaris* ATCC 49132
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461, ATCC 12228
- *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

### 6.3 Equipos

- Congelador a -20 °C (*REVCO*)
- Incubadora a 37 °C (*RIOSSA*)
- Microscopio óptico (*ZEISS*)
- Autoclave

#### 6.4 Medios de cultivo y reactivos

- Agar soya tripticaseína (Difco)
- Caldo soya tripticaseína (Merck)
- Caldo Todd Hewitt (Merck)
- Base agar sangre (Bioxon)
- Agar Citrato de Simmons (Merck)
- Caldo base rojo de fenol (Merck)
- Caldo RMVP (Difco)
- Agar LIA (Merck)
- Medio SIM (Merck)
- Medio MIO (Bioxon)
- Gelatina bacteriológica (Bioxon)
- Carbohidratos (Merck)
- Glicerol anhidro (JT Baker)
- Crystal violeta (Sigma)
- Lugol (Sigma)
- Alcohol-acetona (Sigma)
- Safranina (Sigma)

#### 6.5 Método

##### 6.5.1 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131 y *Proteus vulgaris* ATCC 49132 fueron desarrolladas en medio agar soya tripticaseína, las cepas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Las cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461, ATCC 12228 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 en agar sangre a 37 °C por 24 horas.

## 6.5.2 Caracterización de las cepas

**6.5.2.1 Prueba oxidasa.** Se realiza con bacterias en crecimiento (18 a 24 horas) procedentes de un medio que no contenga azúcar como base. En un pedazo de papel filtro colocado sobre una caja Petri estéril, agregar de dos a tres gotas del reactivo de oxidasa, e inmediatamente esparcir un pequeño inóculo con un palito de madera estéril a través del papel humedecido previamente con el reactivo. La reacción es positiva por la aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel.<sup>42, 43</sup>

**6.5.2.2 Producción de movilidad, indol y ornitina descarboxilasa.** Disolver 31 g del medio deshidratado indol-ornitina (MIO) en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición por un minuto y distribuir en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de algodón, esterilizando a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Dejar en reposo en posición vertical, inocular por picadura, incubar por 24 horas a 37 °C. Observar movilidad y descarboxilación de ornitina. Adicionando cinco gotas del reactivo Kovacs observar la producción de indol, la reacción es positiva cuando hay aparición de un anillo de color rojo en la interfase del medio, negativo si no hay ningún desarrollo de color y variable si se produce un color anaranjado en la superficie.<sup>42</sup>

**6.5.2.3 Prueba rojo de metilo y reacción Voges-Proskauer.** Disolver 17 g del medio deshidratado de RMVP en un litro de agua destilada. Mezclando bien, distribuir en tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón, esterilizándose a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos y dejar enfriar. Inocular e incubar a 37 °C durante 24 horas.<sup>42</sup>

Prueba de rojo de metilo: se agregó 5 gotas de rojo de metilo a 2 mL del cultivo incubado, es positivo cuando el reactivo permanece con un color rojo, negativo color amarillo en la superficie del medio. En la reacción Voges Proskauer; se agregó a 2 mL del cultivo inoculado 0.2 mL de NaOH al 40% y 0.6 mL de alfa naftol, mezclando perfectamente. La lectura final después de 15 minutos, es positivo con aparición de color rosado-rojo y negativo si el color amarillo aparece en la superficie del medio.<sup>42</sup>

**6.5.2.4 Hidrólisis de urea.** Disolver 29 g de urea deshidratada en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Mientras que se disuelve 15 g de agar en 900

mL de agua destilada y esterilizar a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos. Agregar los 100 mL de urea estéril, en condiciones asépticas al agar, distribuir a tubos estériles de 18 x 150 mm con tapón de algodón, enfriándose en posición inclinada. Inocular en el de pico de flauta pero no punzar el fondo, con inóculo denso e incubar a 35 °C durante 24 horas, es positivo cuando aparece un color rosado a rojo intenso en el pico de flauta y negativo cuando no hay cambio de color.<sup>42</sup>

**6.5.2.5 Fenilalanina desaminasa.** Suspender 23 g del medio de fenilalanina en un litro de agua destilada, calentando cuidadosamente hasta disolución, distribuir en tubos de 18 x 150 mm con tapón de algodón esterilizando a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada, sembrar con un inóculo denso e incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas, se agregan directamente 4-5 gotas de cloruro férrico al 10%, deslizándolo por el pico de flauta, la prueba es positiva cuando hay formación de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y negativa si no hay cambios, permanece amarillo debido al reactivo.<sup>42, 44</sup>

**6.5.2.6 Descarboxilación de la lisina.** Suspender 33 g del medio deshidratado agar hierro-lisina (LIA) en un litro de agua destilada. Calentando cuidadosamente, agitar con frecuencia y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón esterilizando a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada, inoculándose el fondo del medio por picadura y la superficie en estría e incubar a 37 °C durante 24 horas, la prueba es positiva cuando el pico de flauta es color púrpura y el extremo inferior púrpura (alcalino) y negativa si el pico de flauta es púrpura, y extremo inferior amarillo.<sup>42, 44</sup>

**6.5.2.7 Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa junto a formación de H<sub>2</sub>S.** Hidratar 59.4 g del medio agar hierro triple azúcar (TSI) en un litro de agua destilada. Calentar con agitación frecuente hasta ebullición. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón, esterilizando a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar y solidificar en posición inclinada. Inocular el fondo del medio por picadura y sembrar la superficie con inóculo denso, incubar a 37 °C durante 24 horas. Reacción ácido- ácido (amarillo/amarillo) fermentación de glucosa y lactosa, reacción alcalino- ácido (rojo/amarillo) solo fermenta glucosa, alcalino- alcalino (rojo/rojo) no

fermenta glucosa ni lactosa. El rompimiento del agar la aparición de gas y la aparición de oscurecimiento del medio significa producción de H<sub>2</sub>S. <sup>42</sup>

**6.5.2.8 Licuefacción de gelatina.** Agregar 30 g de medio gelatina nutritiva en un litro de agua y dejar reposar, posteriormente calentar suavemente hasta disolver el medio. Distribuir en tubos 13 x 100 mm esterilizándose a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos. Enfriar en posición vertical para su inoculación por punción. Incubar a 35 °C por 24 horas el tubo inoculado con respecto a un tubo sin inocular (tubo control) y positivo cuando el medio se hace líquido a comparación con el tubo control que se mantiene sólido. <sup>45</sup>

**6.5.2.9 Fermentación de hidratos de carbono.** Disolver 16 g del caldo básico de rojo de fenol en un litro de agua destilada, agregar directamente 10 g del azúcar que se desee para obtener una concentración del 1%. Mezclando bien, distribuir en tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón, esterilizándose a 116- 118 °C, 10 a 12 libras de presión por 15 minutos y dejar enfriar. Inocular por difusión e incubar a 37 °C durante 18 a 24 horas, la reacción es ácida cuando hay vire amarillo y negativo si el tubo se torna rosa o rojizo. <sup>42, 45</sup>

**6.5.2.10 Utilización de citrato.** Suspender 22 g del medio Citrato de Simmons en un litro de agua destilada, calentando suavemente hasta su disolución, distribuir en tubos de 18 x 150 mm con tapón de algodón y esterilizar a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar y solidificar en posición inclinada, sembrar la superficie del medio e incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas, positivo cuando aparece un color azul intenso en el pico de flauta y negativo sin cambio en el color del medio (verde). <sup>42, 44</sup>

**6.5.2.11 Utilización de acetato** El medio acetato es preparado en la misma manera como el agar citrato de Simmons excepto que es utilizado el 0.25% de acetato de sodio en lugar de citrato. Esto es usado para determinar cual microorganismo es capaz de utilizar acetato como única fuente de carbono, es positivo al desarrollarse un color azul y negativo sin cambio en el color del medio. <sup>44</sup>

**6.5.2.12 Reducción de nitrato.** Disolver 17 g del caldo con nitrato, calentar suavemente hasta disolución y distribuir en tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón. Esterilizar a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos. Enfriar e inocular por difusión, incubándose a 35 °C de 18 a 24 horas. Posteriormente agregar 5 gotas del reactivo  $\alpha$ -naftilamina y cinco gotas de ácido sulfanílico, después de un tiempo se interpretan los resultados, positivo si aparece color rosado a rojo intenso.<sup>42</sup>

**6.5.2.13 Agar para prueba DNAsa (Desoxirribonucleasa).** Suspender 42 g del medio en un litro de agua destilada remojando de diez a quince minutos y mezclando con todo cuidado. Se agrega en ese momento 10 g de manitol y 0.025 g de azul de bromotimol. Mezclando cuidadosamente de nuevo para obtener una suspensión homogénea, calentar a ebullición durante un minuto. Esterilizarse en autoclave de 12 a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriando a 45- 50 °C y posteriormente vaciar en cajas Petri.<sup>45</sup>

Adicionar después del desarrollo bacteriano una gota de ácido clorhídrico normal o unas gotas de azul de toluidina al 10%. Con algunas cepas a veces necesario aumentar la concentración de HCl a 2N para obtener una reacción nítida para que aparezca bien definida en la formación del halo claro alrededor del desarrollo bacteriano. En presencia de ácido clorhídrico diluido, este reacciona con el ácido desoxirribonucleico (ADN) del medio de cultivo formando un precipitado nebuloso. En cambio, las colonias productoras de desoxirribonucleasa, aparecieron rodeadas de una zona o halo claro que contienen fracciones de nucleótidos solubles procedentes de la degradación del ADN, que no son precipitados por el ácido clorhídrico. Prueba positiva cuando hay un precipitado alrededor de la colonia, además de un halo color rosa.<sup>45</sup>

#### **6.5.2.14 Prueba catalasa**

Con una aguja de inoculación se recoge el centro de una de las colonias aisladas y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio, agregar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Inmediatamente observar la formación de burbujas liberación de gas.<sup>42</sup>

### 6.5.2.15 Hemólisis

Las placas de agar sangre se preparan disolviendo 40 g del agar en un litro de agua destilada, calentando suavemente. Se esterilizan a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar lo suficiente para agregar la sangre de carnero desfibrinada estéril y mezclar con movimientos ligeros, para después distribuirlo en cajas Petri permitiendo solidificarse, sembrar las cajas incubándose a 35 °C durante 24 a 48 hrs.<sup>38</sup>

La observación e interpretación de las propiedades hemolíticas es muy importante y se debe de examinar con transiluminación con una luz brillante por detrás de la placa para detectar reacciones hemolíticas en el agar, el tipo de hemólisis dependiendo del microorganismo puede ser:<sup>38</sup>

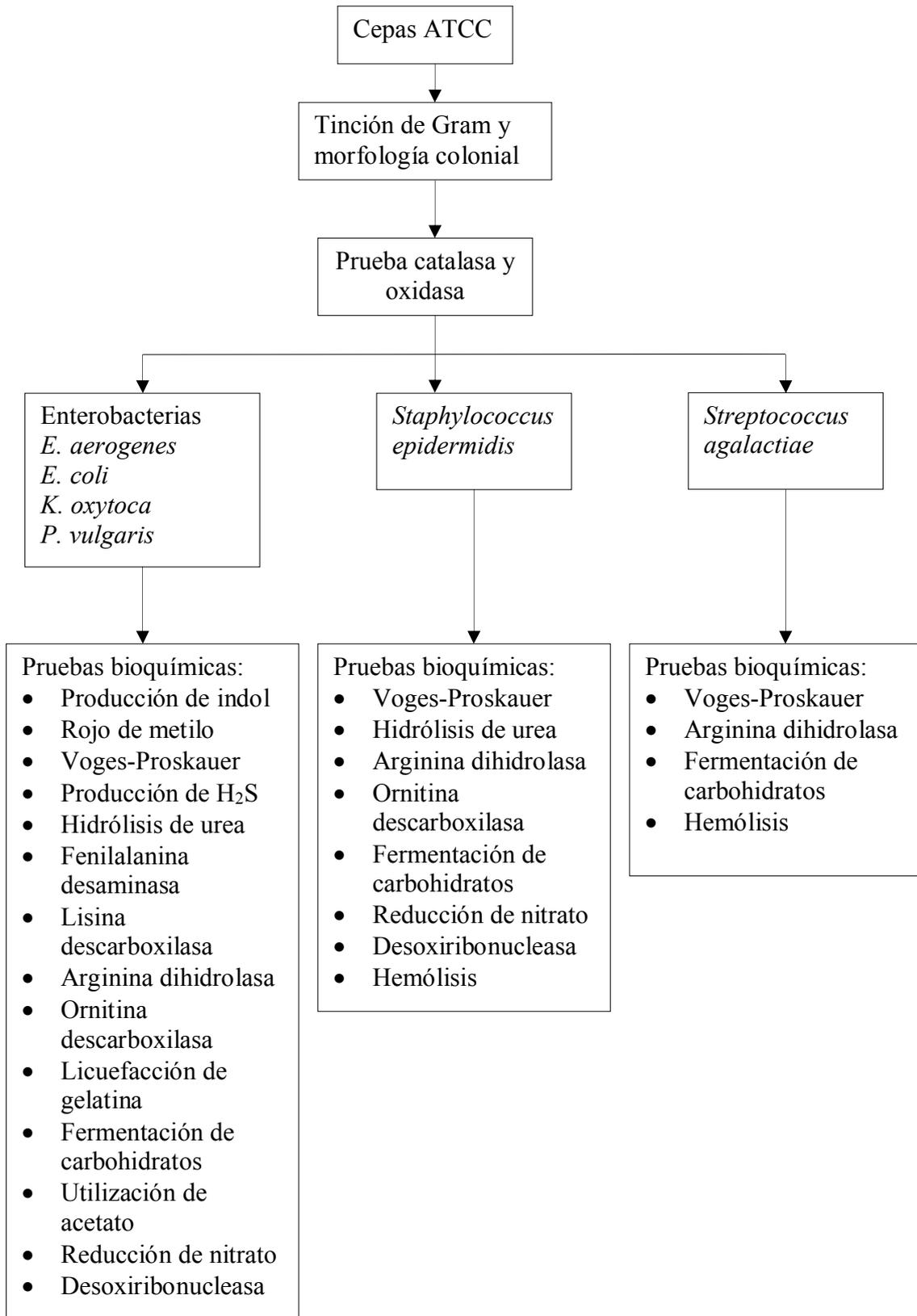
$\alpha$ -hemólisis: Lisis parcial de los eritrocitos que rodean la colonia, que produce un cambio de color gris-verdoso o amarronado del medio de cultivo.<sup>38</sup>

$\beta$ -hemólisis: Lisis completa de los glóbulos rojos que rodean una colonia, que produce una eliminación total de la sangre del medio de cultivo.<sup>38</sup>

$\gamma$ -hemólisis: Ausencia de hemólisis y en consecuencia ninguna alteración de color del medio que rodea a una colonia. Los microorganismos que no producen hemólisis se denominan habitualmente no hemolíticos, en lugar de  $\gamma$ -hemolíticos.<sup>38</sup>

$\alpha$  prima: Un pequeño halo de eritrocitos intactos inmediatamente adyacente a la colonia, con un halo de hemólisis completa que rodea el halo de eritrocitos intactos, suele confundirse muy seguido con la  $\beta$ -hemólisis.<sup>38</sup>

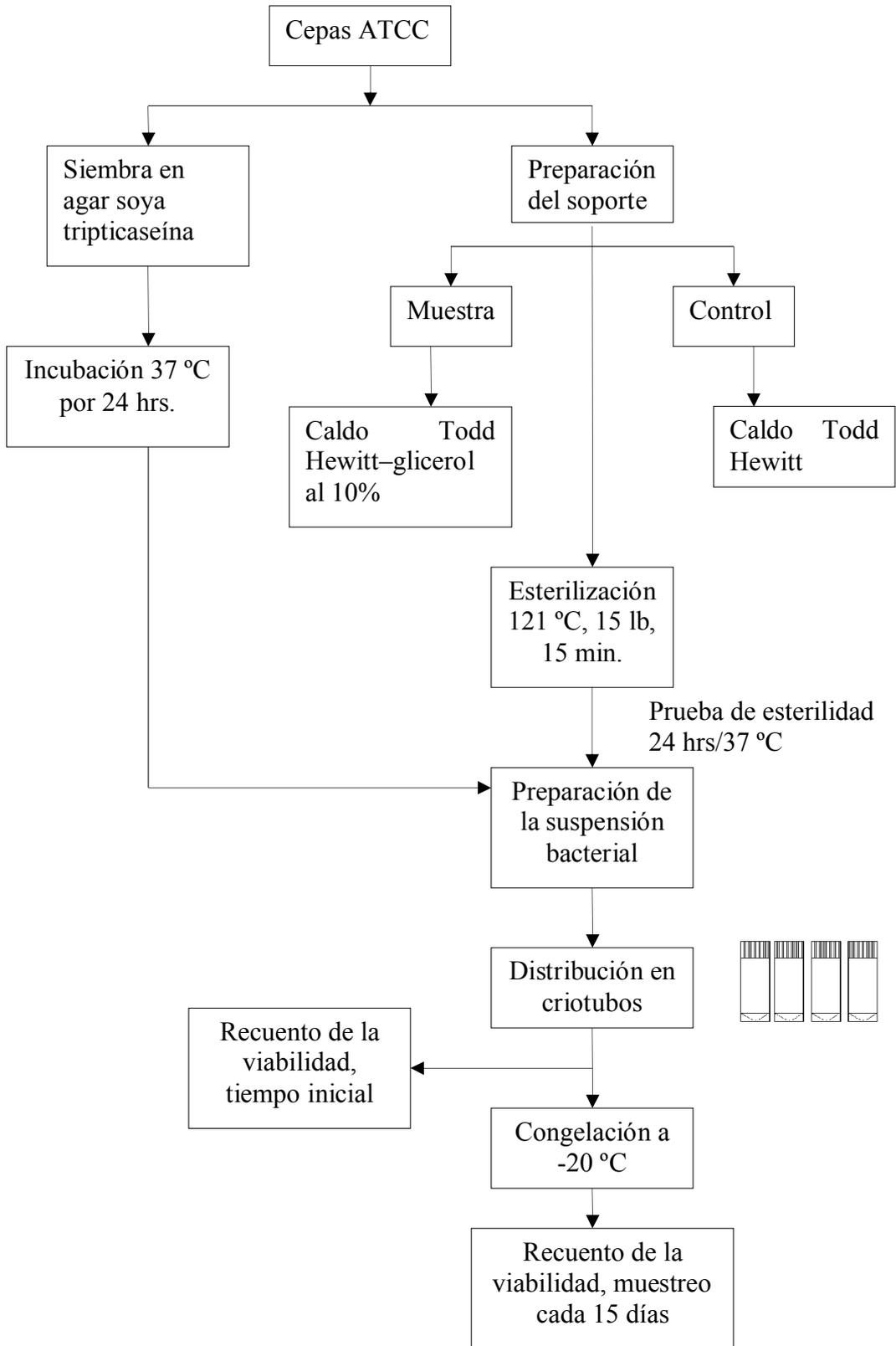
Diagrama 2. Caracterización de las cepas



### 6.5.3 Preparación de la suspensión de las bacterias

- La suspensión para bacterias aerobias se preparó con caldo Todd Hewitt y glicerol al 10%, esta mezcla se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min.
- Se necesitan viales estériles o criotubos, los cuales son cerrados y esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min. Los viales estériles pueden ser almacenados en un cuarto a la temperatura requerida.
- Se requirió hacer un crecimiento bacteriano en un medio sólido no selectivo, en este caso se utilizó agar soya tripticaseína y se sometieron a condiciones óptimas de crecimiento, 37 °C por 24 horas.
- Asépticamente añadir 2 mL de suspensión al agar inclinado.
- Suspender el cultivo usando un asa y mezclar completamente la suspensión resultante.
- Asépticamente distribuir la suspensión celular dentro del criotubo. Aspirar la suspensión varias veces y asegurar que las burbujas de aire dentro son sacadas por la suspensión bacterial.
- Depositar en los contenedores los criotubos con la suspensión bacteriana. Poner estos directamente en un congelador a -20°C.
- Para recuperar las bacterias: sacar un criotubo del congelador y abrirlo bajo condiciones asépticas. Usando un asa estéril, tomar una muestra. Inmediatamente regresar el tubo al congelador para prevenir al volumen restante de la descongelación.
- Directamente inocular dentro de un medio líquido, caldo soya tripticaseína, para evaluar su viabilidad.<sup>25</sup>

Diagrama 3. Preparación de la suspensión de las bacterias



#### 6.5.4 Método Miles y Misra para recuento de viabilidad (por goteo)

1. Las placas de agar soya tripticaseína se secan en la estufa en posición inclinada, evitando así que haya goteo en la superficie de la placa.
2. Dividir la parte inferior de la placa, en 8 secciones, en las que se anota  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y así sucesivamente, hasta  $10^{-8}$ .
3. Añadir con una micropipeta 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular a 90  $\mu\text{L}$  de caldo soya tripticaseína, mezclar y pasar 10  $\mu\text{L}$  de esta dilución al tubo 2. Homogenizar y transferir 10  $\mu\text{L}$  en el sector marcado con  $10^{-1}$ .
4. Utilizando otra pipeta repetir la operación con el tubo 2, es decir, homogenizar y añadir 10  $\mu\text{L}$  en el sector marcado con  $10^{-2}$  y 10  $\mu\text{L}$  al tubo 3, así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-8}$ . No mover las placas, al menos durante 30 minutos o hasta que el medio absorba las gotas. A continuación, las placas se incuban durante 18 horas.
5. Se cuentan los sectores que contengan alrededor de 20 colonias.
6. Se realizarán los cálculos para obtener UFC/mL.

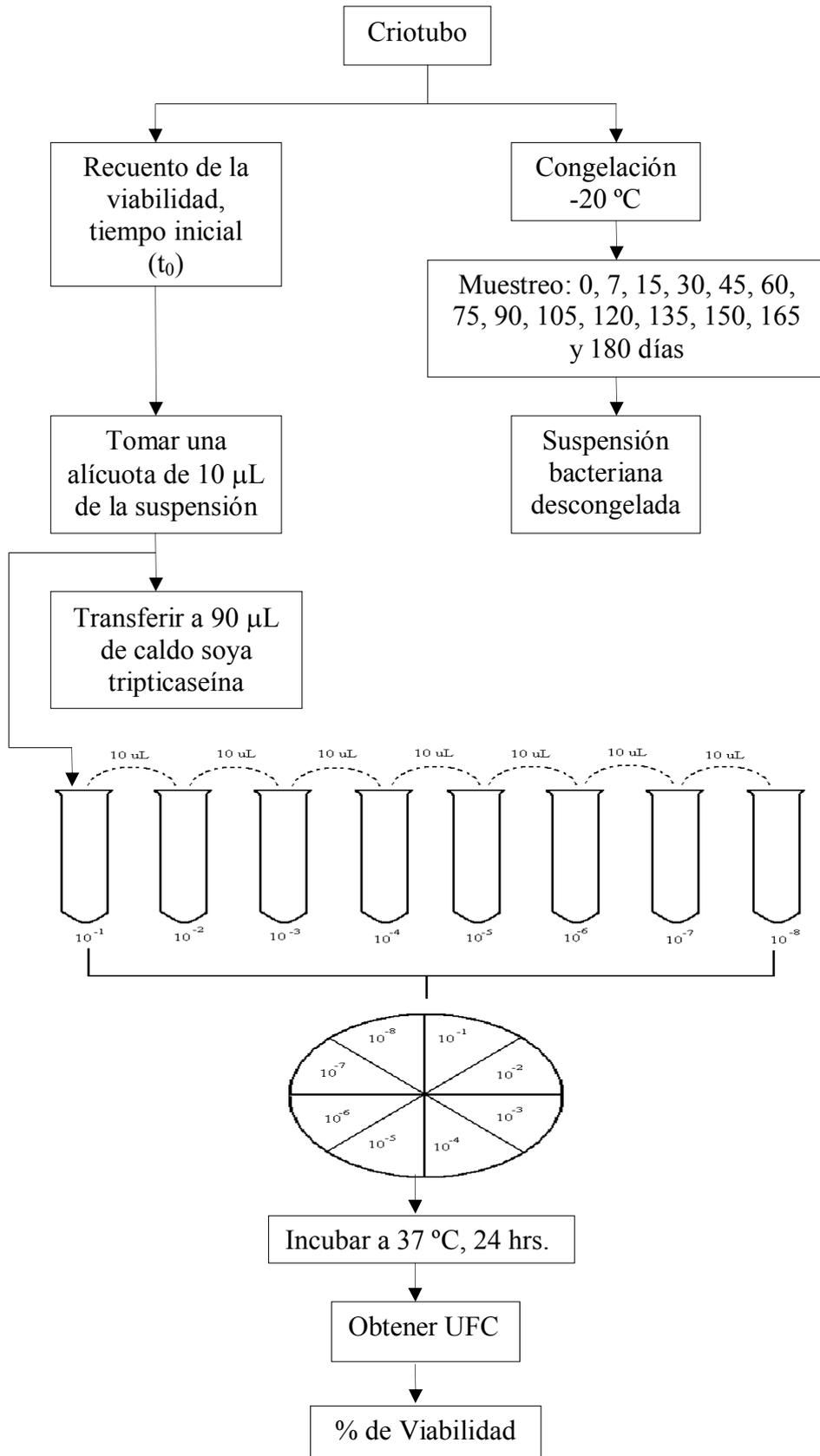
$$\frac{(\text{Factor de dilución})(\# \text{ de colonias contadas})}{0.01 \text{ mL}} = \text{UFC/mL}$$

7. Una vez calculadas las UFC/mL se realizó el cálculo del porcentaje de viabilidad:

$$\frac{(\text{UFC/mL } t = n)(100\%)}{\text{UFC/mL } t = 0} = \% \text{ de viabilidad en el tiempo } n$$

8. Criterios tomados para la realización de la cuenta viable para el método de conservación por congelación:
  - a. Una vez realizada la suspensión bacteriana se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se realizó una cuenta viable antes de congelar, esto con el fin de conocer la concentración inicial bacteriana ( $t=0$ ).
  - b. Posteriormente cada 15 días se tomaron muestras de las suspensiones bacterianas para realizarles cuentas viables ( $t=n$ ), hasta los 180 días, para conocer el efecto de la congelación en su almacenaje.<sup>39, 46, 47</sup>

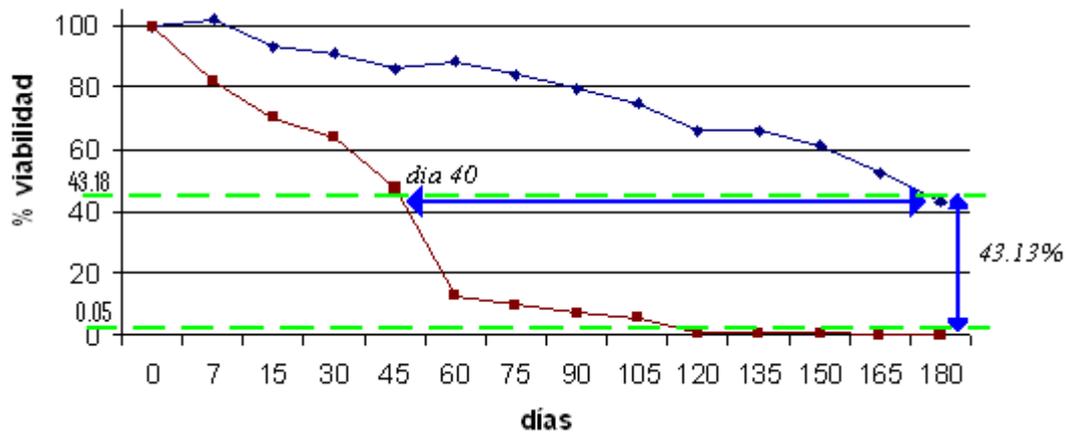
Diagrama 4. Método Miles y Misra para recuento de viabilidad



## VII. RESULTADOS

### 1. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

Como se puede observar en la Gráfica 1, en la suspensión con crioprotector se obtuvo una viabilidad del 43.18% después de 180 días y en la suspensión sin crioprotector, se obtuvo una viabilidad del 0.05%, donde se puede observar un efecto drástico en la viabilidad de la suspensión sin crioprotector, lo que significa una diferencia del 43.13% menor a la suspensión con crioprotector.



Gráfica 1. Viabilidad de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

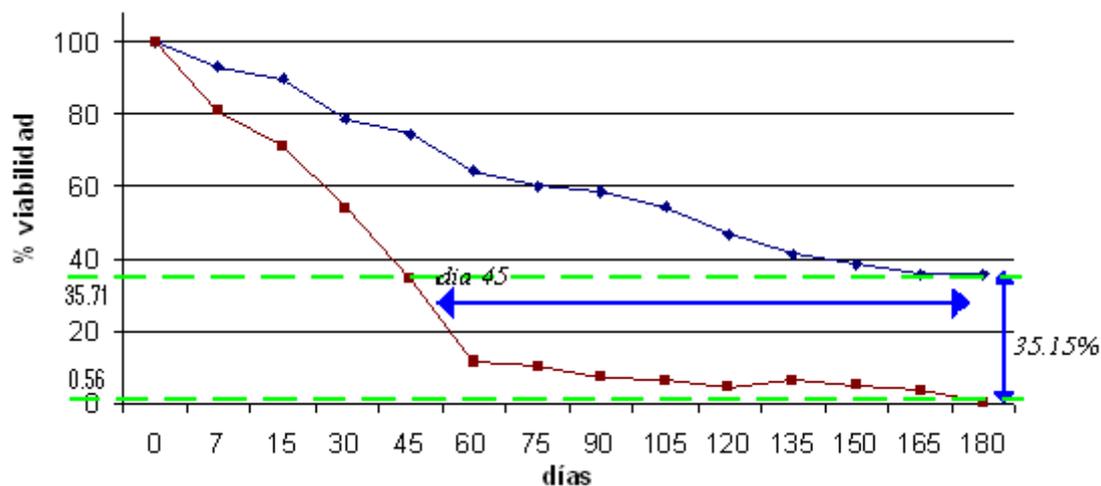
Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                             | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|-------------------------------------|----------------|--|--|
| Oxidasa                             | -              | -  | -  |
| Producción de Indol                 | -              | -  | -  |
| Rojo de metilo                      | -              | -  | -  |
| Voges-Proskauer                     | +              | +  | +  |
| Producción de H <sub>2</sub> S      | -              | -  | -  |
| Hidrólisis de Urea                  | -              | -  | -  |
| Fenilalanina<br>desaminasa          | -              | -  | -  |
| Lisina descarboxilasa               | +              | +  | +  |
| Arginina dihidrolasa                | V              | -  | -  |
| Ornitina descarboxilasa             | +              | +  | +  |
| Hidrólisis de gelatina              | -              | -  | -  |
| TSI                                 | A/A            | A/A  | A/A  |
| Producción de ácido a<br>partir de: |                |  |  |
| Manitol                             | A              | A  | V  |
| Sacarosa                            | A              | A  | A  |
| Glucosa                             | A              | V  | V  |
| Lactosa                             | A              | A  | A  |
| Sorbitol                            | V              | A  | A  |
| Trehalosa                           | A              | A  | A  |
| Rafinosa                            | A              | A  | A  |
| Salicina                            | V              | A  | A  |
| Maltosa                             | A              | A  | A  |
| Utilización de acetato              | -              | -  | -  |
| Reducción de Nitrato                | +              | +  | +  |
| Desoxiribonucleasa                  | -              | -  | -  |
| Catalasa                            | +              | +  | +  |

- = Negativo a la prueba  
 + = Positivo a la prueba  
 A = Fermentación ácida  
 V = Resultado variable

## 2. *Escherichia coli* ATCC 25922

En la Gráfica 2 se observa que la viabilidad de la suspensión de *E. coli* con crioprotector es de 35.75%, mientras la viabilidad de la suspensión sin crioprotector decae hasta 0.56% de la concentración original, lo que quiere decir que hay una diferencia del 35.15% entre las dos suspensiones.



Gráfica 2. Viabilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* ATCC 25922, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                             | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|-------------------------------------|----------------|--|--|
| Oxidasa                             | -              | -  | -  |
| Producción de Indol                 | +              | +  | +  |
| Rojo de metilo                      | +              | +  | +  |
| Voges-Proskauer                     | -              | -  | -  |
| Producción de H <sub>2</sub> S      | -              | -  | -  |
| Hidrólisis de Urea                  | -              | -  | -  |
| Fenilalanina<br>desaminasa          | -              | -  | -  |
| Lisina descarboxilasa               | +              | +  | +  |
| Arginina dihidrolasa                | +              | +  | +  |
| Ornitina descarboxilasa             | +              | +  | +  |
| Hidrólisis de gelatina              | -              | -  | -  |
| TSI                                 | A/A            | A/A  | A/A  |
| Producción de ácido a<br>partir de: |                |  |  |
| Manitol                             | A              | A  | A  |
| Sacarosa                            | -              | -  | -  |
| Glucosa                             | A              | A  | A  |
| Lactosa                             | A              | A  | A  |
| Sorbitol                            | A              | A  | A  |
| Trehalosa                           | A              | A  | A  |
| Rafinosa                            | -              | -  | -  |
| Salicina                            | -              | -  | -  |
| Maltosa                             | A              | A  | A  |
| Utilización de acetato              | +              | +  | +  |
| Reducción de Nitrato                | +              | +  | +  |
| Desoxiribonucleasa                  | -              | -  | -  |
| Catalasa                            | +              | +  | +  |

– = Negativo a la prueba

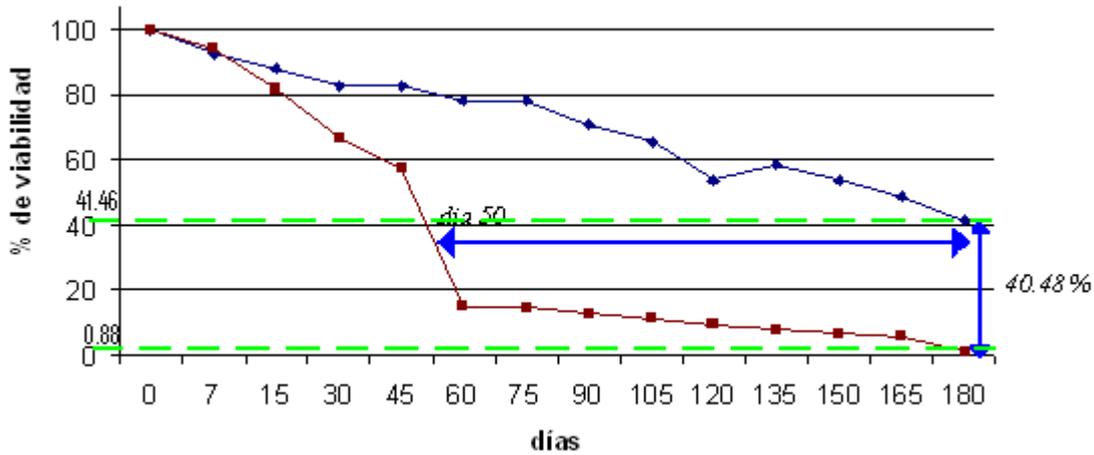
+ = Positivo a la prueba

A = Fermentación ácida

V = Resultado variable

### 3. *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131

La suspensión con crioprotector que contiene a *K. oxytoca* da un porcentaje de viabilidad del 41.46% de la viabilidad inicial, mientras que para la suspensión sin glicerol se obtiene una viabilidad de 0.88%, dando una diferencia del 40.58% lo que nos hace ver un rango considerable de viabilidad entre las dos suspensiones (Gráfica 3).



Gráfica 3. Viabilidad de *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131 a -20 °C.

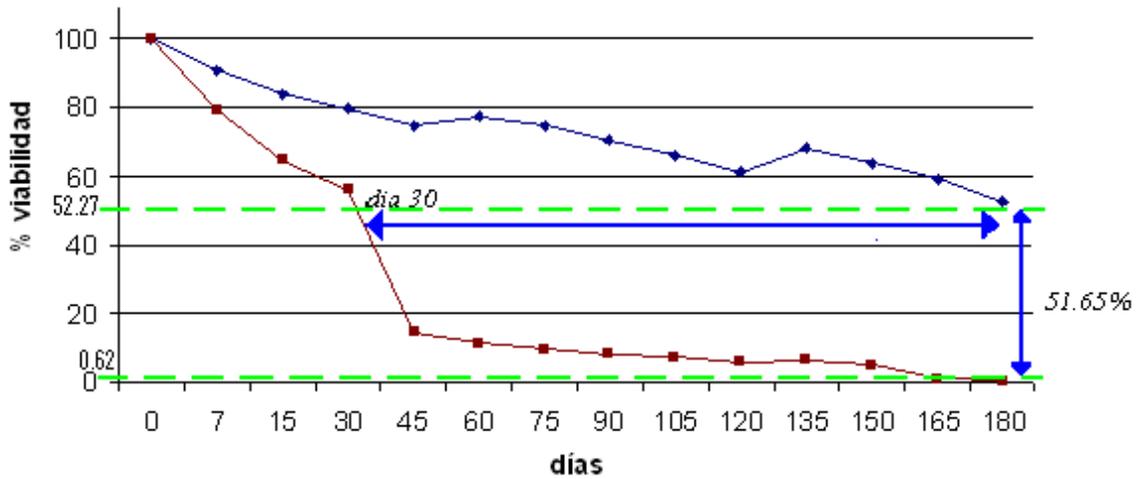
- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 5. Pruebas bioquímicas para *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                             | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|-------------------------------------|----------------|--|--|
| Oxidasa                             | -              | -  | -  |
| Producción de Indol                 | +              | +  | +  |
| Rojo de metilo                      | -              | -  | -  |
| Voges-Proskauer                     | +              | +  | +  |
| Producción de H <sub>2</sub> S      | -              | -  | -  |
| Hidrólisis de Urea                  | +              | +  | +  |
| Fenilalanina<br>desaminasa          | -              | -  | -  |
| Lisina descarboxilasa               | +              | +  | +  |
| Arginina dihidrolasa                | V              | V  | -  |
| Ornitina descarboxilasa             | -              | -  | -  |
| Hidrólisis de gelatina              | -              | -  | -  |
| TSI                                 | A/A            | A/A  | A/A  |
| Producción de ácido a<br>partir de: |                |  |  |
| Manitol                             | A              | A  | A  |
| Sacarosa                            | A              | A  | A  |
| Glucosa                             | A              | A  | V  |
| Lactosa                             | A              | A  | A  |
| Sorbitol                            | A              | A  | A  |
| Trehalosa                           | A              | A  | A  |
| Rafinosa                            | A              | A  | A  |
| Salicina                            | A              | A  | A  |
| Maltosa                             | A              | A  | A  |
| Utilización de acetato              | +              | +  | +  |
| Reducción de Nitrato                | +              | +  | +  |
| Desoxiribonucleasa                  | -              | -  | -  |
| Catalasa                            | +              | +  | +  |

#### 4. *Proteus vulgaris* ATCC 49132

En la Gráfica 4 se observa un porcentaje de viabilidad de la suspensión con glicerol del 52.27% con respecto a la suspensión sin crioprotector que es del 0.62%, la diferencia que existe entre las dos suspensiones es del 51.65%.



Gráfica 4. Viabilidad de *Proteus vulgaris* ATCC 49132 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas para *Proteus vulgaris* ATCC 49132, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                          | Prueba Inicial | Prueba Final Cepas con crioprotector | Prueba Final Cepas sin crioprotector |
|----------------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Oxidasa                          | -              | -                                    | -                                    |
| Producción de Indol              | +              | +                                    | +                                    |
| Rojo de metilo                   | +              | +                                    | +                                    |
| Voges-Proskauer                  | -              | -                                    | -                                    |
| Producción de H <sub>2</sub> S   | +              | +                                    | +                                    |
| Hidrólisis de Urea               | +              | +                                    | +                                    |
| Fenilalanina desaminasa          | +              | +                                    | +                                    |
| Lisina descarboxilasa            | -              | -                                    | -                                    |
| Arginina dihidrolasa             | -              | -                                    | -                                    |
| Ornitina descarboxilasa          | -              | -                                    | -                                    |
| Hidrólisis de gelatina           | -              | -                                    | -                                    |
| TSI                              | A/A            | A/A                                  | A/A                                  |
| Producción de ácido a partir de: |                |                                      |                                      |
| Manitol                          | -              | -                                    | -                                    |
| Sacarosa                         | A              | A                                    | A                                    |
| Glucosa                          | A              | A                                    | A                                    |
| Lactosa                          | -              | -                                    | -                                    |
| Sorbitol                         | -              | -                                    | -                                    |
| Trehalosa                        | -              | -                                    | -                                    |
| Rafinosa                         | -              | -                                    | -                                    |
| Salicina                         | A              | A                                    | A                                    |
| Maltosa                          | A              | A                                    | A                                    |
| Utilización de acetato           | -              | -                                    | -                                    |
| Reducción de Nitrato             | +              | +                                    | +                                    |
| Desoxiribonucleasa               | -              | -                                    | -                                    |
| Catalasa                         | +              | +                                    | +                                    |

– = Negativo a la prueba

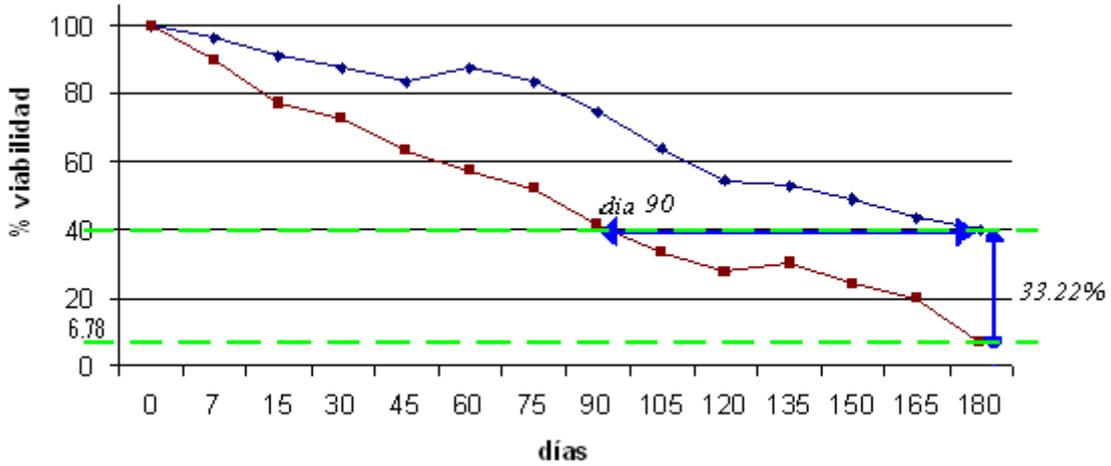
+ = Positivo a la prueba

A = Fermentación ácida

V = Resultado variable

5. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Como se observa en la Gráfica 5 *S. epidermidis* ATCC 12228, hay una viabilidad después de 180 días en la suspensión con crioprotector de 40% y para la suspensión sin crioprotector es del 6.78%, con una diferencia entre las dos muestras de 33.22%.



Gráfica 5. Viabilidad de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 7. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                          | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|----------------------------------|----------------|--|--|
| Voges-Proskauer                  | +              | +  | V  |
| Hidrólisis de Urea               | -              | -  | -  |
| Arginina dihidrolasa             | -              | -  | V  |
| Ornitina descarboxilasa          | +              | +  | +  |
| Producción de ácido a partir de: |                |  |  |
| Manitol                          | -              | -  | -  |
| Sacarosa                         | A              | A  | A  |
| Lactosa                          | A              | A  | A  |
| Trehalosa                        | -              | -  | -  |
| Rafinosa                         | -              | -  | -  |
| Salicina                         | -              | -  | -  |
| Maltosa                          | A              | A  | A  |
| Reducción de Nitrato             | +              | +  | +  |
| Desoxiribonucleasa               | -              | -  | -  |
| Catalasa                         | +              | +  | +  |
| Hemólisis                        | β              | β  | β  |

– = Negativo a la prueba

+ = Positivo a la prueba

A = Fermentación ácida

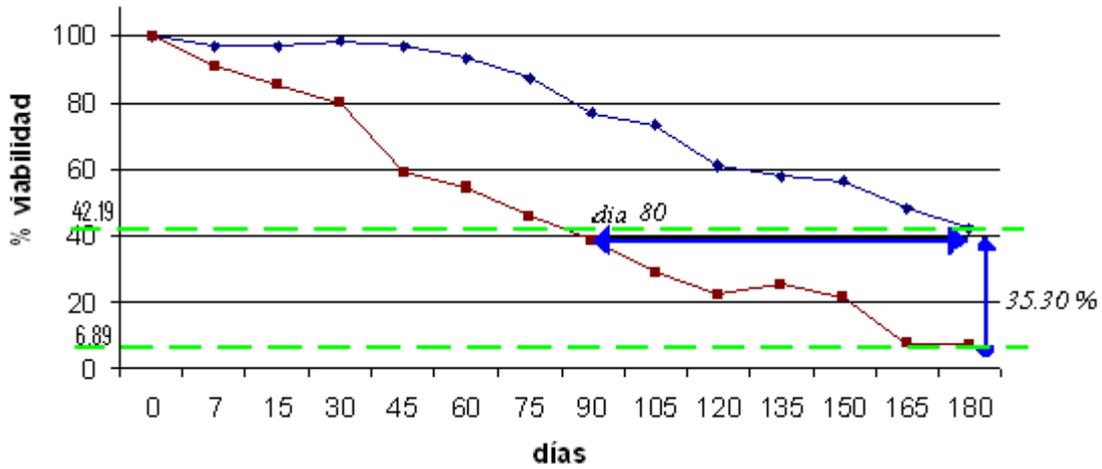
V = Resultado variable

α = α-hemólisis

β = β-hemólisis

## 6. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461

Se obtuvo una viabilidad del 42.19% para la suspensión con crioprotector de *S. epidermidis* ATCC 49461, y para la suspensión sin crioprotector del 6.89%, esto da una diferencia entre las dos suspensiones del 35.3%, Gráfica 6.



Gráfica 6. Viabilidad de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 8. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                          | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|----------------------------------|----------------|--|--|
| Voges-Proskauer                  | +              | +  | V  |
| Hidrólisis de Urea               | -              | -  | -  |
| Arginina dihidrolasa             | -              | V  | -  |
| Ornitina descarboxilasa          | V              | V  | V  |
| Producción de ácido a partir de: |                |  |  |
| Manitol                          | -              | -  | -  |
| Sacarosa                         | A              | A  | A  |
| Lactosa                          | A              | A  | A  |
| Trehalosa                        | -              | -  | -  |
| Rafinosa                         | -              | -  | -  |
| Salicina                         | -              | -  | -  |
| Maltosa                          | A              | A  | A  |
| Reducción de Nitrato             | +              | +  | +  |
| Desoxiribonucleasa               | -              | -  | -  |
| Catalasa                         | +              | +  | +  |
| Hemólisis                        | β              | β  | β  |

– = Negativo a la prueba

+ = Positivo a la prueba

A = Fermentación ácida

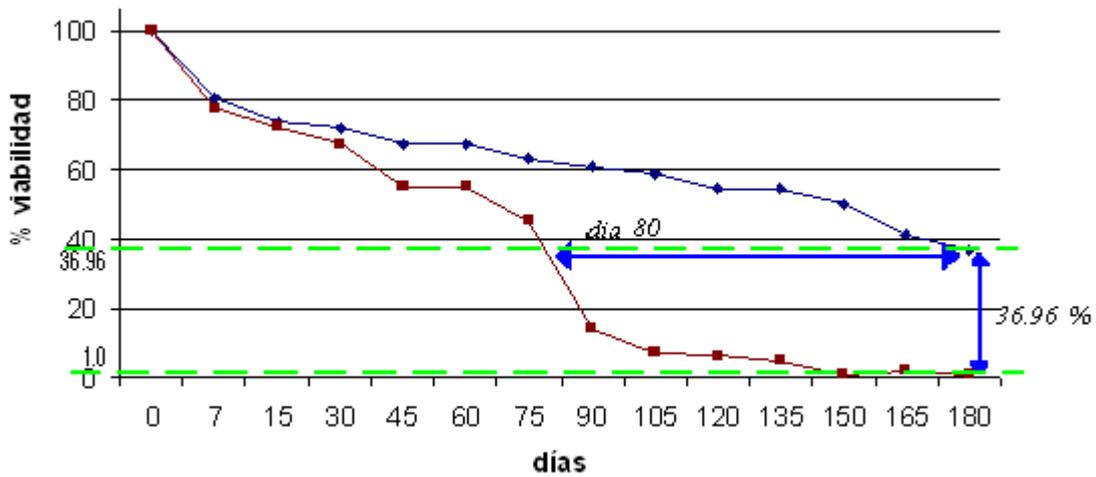
V = Resultado variable

α = α-hemólisis

β = β-hemólisis

### 7. *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

En la Gráfica 7, se obtuvo una viabilidad para la suspensión con crioprotector del 36.96% y un porcentaje de viabilidad del 1% para la suspensión sin crioprotector donde la diferencia entre las dos es del 35.96% para el *S. agalactiae*.



Gráfica 7. Viabilidad de *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 a -20 °C.

- ◆ Suspensión con crioprotector (caldo soya tripticaseína-glicerol al 10%)
- Suspensión sin crioprotector (caldo soya tripticaseína)

Cuadro 9. Pruebas bioquímicas para *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, prueba confirmatoria previa al estudio inicial y prueba confirmatoria final.

| Pruebas                          | Prueba Inicial | Prueba Final<br>Cepas con<br>crioprotector | Prueba Final<br>Cepas sin<br>crioprotector |
|----------------------------------|----------------|--|--|
| Voges-Proskauer                  | +              | +  | V  |
| Arginina dihidrolasa             | -              | -  | -  |
| Producción de ácido a partir de: |                |  |  |
| Manitol                          | -              | -  | -  |
| Lactosa                          | V              | +  | V  |
| Sorbitol                         | -              | -  | -  |
| Trehalosa                        | V              | V  | -  |
| Rafinosa                         | -              | -  | -  |
| Salicina                         | -              | -  | -  |
| Hemólisis                        | $\alpha$       | $\alpha$                                   | $\alpha$                                   |

– = Negativo a la prueba

+ = Positivo a la prueba

A = Fermentación ácida

V = Resultado variable

$\alpha$  =  $\alpha$ -hemólisis

$\beta$  =  $\beta$ -hemólisis

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

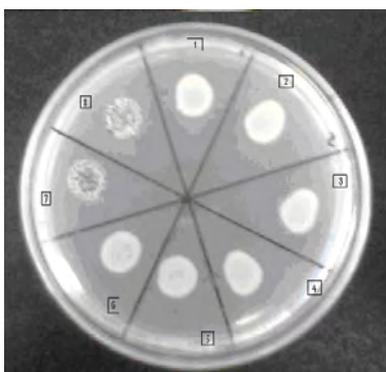
En este método de conservación es fundamental que se evitaren lesiones en las células bacterianas provocadas por la congelación, como la formación de cristales de hielo y el daño provocado por el aumento en la concentración de solutos durante la formación progresiva de los cristales de hielo en la suspensión que afectan la viabilidad celular. Esto puede ser provocado con el aumento de la permeabilidad en los solutos intracelulares dando como resultado la deshidratación celular, es por esto que son utilizados rutinariamente los crioprotectores para la conservación de las cepas bacterianas, modifican la tonicidad de las células haciendo posible el que las velocidades de enfriamiento sean lentas, de esta manera se minimiza la congelación intracelular.<sup>11, 48</sup>

Los pocos estudios que se han hecho detallando la congelación a -20 °C han demostrado un menor porcentaje en la viabilidad de las cepas al ser conservadas, con respecto a la liofilización y a la crioconservación que tienden a ser métodos estandarizados por un período largo, ambos métodos de preservación proveen variación exitosa de diferentes especies de bacterias, aunque hay que mencionar que ninguna técnica resulta con el 100% de recuperación de las células conservadas, además, cuando no se cuenta con los recursos necesarios para aplicar éstas técnicas se hace una búsqueda de alternativas.<sup>49, 24</sup>

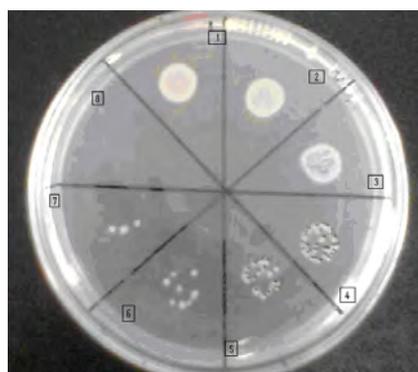
Además, otro factor en donde el crioprotector tienen un aspecto importante es el minimizar el riesgo en el proceso de congelación de bacterias por la formación de cristales de hielo fuera de la célula, ya que sin el crioprotector se produce la salida de agua desde el interior de esta, lo que provoca un aumento de la concentración intracelular de electrolitos y la desnaturalización de las proteínas. La membrana celular se lesiona y tiene lugar una pérdida de compuestos orgánicos intracelulares.<sup>36, 50</sup>

Este proyecto probó y evaluó el método de conservación de una suspensión bacteriana con un agente crioprotector, en este caso glicerol al 10%, con respecto a una suspensión que no contenga el crioprotector, para congelarse a -20 °C, evaluando la viabilidad por 180 días; observándose los siguiente en cada caso particular.

En la suspensión de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y como se ve en la Gráfica 1, después de 180 días se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 43.18% en la suspensión con crioprotector, mientras que en la suspensión sin crioprotector equivale a lo aproximado a 40 días. Al final del tiempo de la prueba de la suspensión control (sin crioprotector) se obtiene una viabilidad del 0.05%, lo que significa una diferencia del 43.13% menor a la suspensión con crioprotector; es decir que en la suspensión celular la viabilidad celular es casi nula debido a la ausencia del crioprotector, con lo que se puede determinar que en el primer caso la cepa aun es viable para poder utilizarla, mientras que para el segundo caso no. Esto se puede observar claramente en la Figura 1 que muestra la placa de *E. aerogenes* con crioprotector al final del estudio como hay crecimiento en la dilución  $10^{-8}$  manteniendo un buen porcentaje de viabilidad, mientras que en la Figura 2 se ve el efecto adverso que ha sufrido la misma bacteria en la suspensión sin crioprotector. Finalmente en el Cuadro 3 no muestra una variación significativa en las pruebas bioquímicas, por lo que no hay cambio en su metabolismo.



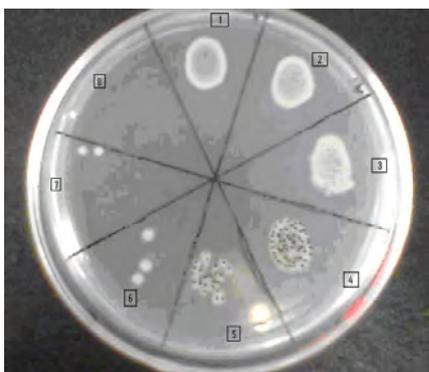
**Figura 1. Recuento de viabilidad de *E. aerogenes* ATCC 13048, suspensión con crioprotector.**



**Figura 2. Recuento de viabilidad de *E. aerogenes* ATCC 13048, suspensión control (sin crioprotector)**

En la Gráfica 2 se observa la viabilidad final en la suspensión de *E. coli* ATCC 25922 muestra con crioprotector de 35.71%, mientras la viabilidad en la suspensión sin crioprotector sufre un efecto drástico, decae hasta 0.56% de la concentración original. Lo que quiere decir que hay una diferencia del 35.15%, es decir que el efecto del crioprotector es muy considerable e importante para la supervivencia de la bacteria, aproximadamente cuando en la suspensión control tiene 45 días de congelación su porcentaje de viabilidad es similar al obtenido finalmente por la suspensión con

crioprotector. Esto se ve claramente en la Figura 3 la cual presenta crecimiento en la dilución  $10^{-5}$  a diferencia de la Figura 4 donde el crecimiento apenas es visible en la dilución  $10^{-2}$ . Por otro lado se puede observar en el Cuadro 4 que no hay variación significativa en las pruebas bioquímicas, por lo que hay una estabilidad del inicio al final del estudio.

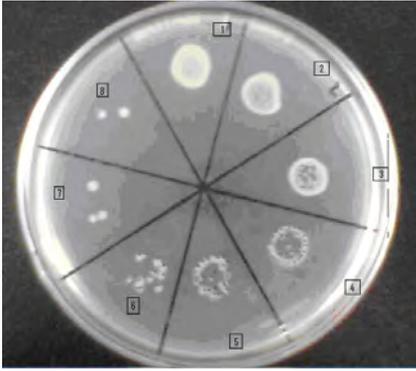


**Figura 3. Recuento de viabilidad de *E. coli* ATCC 25922, suspensión con crioprotector.**

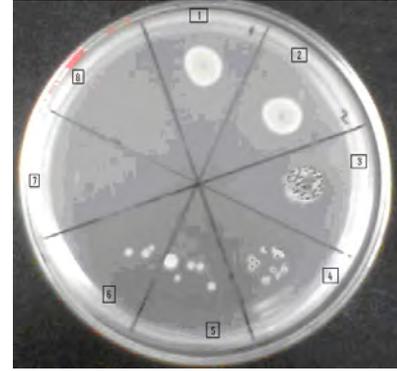


**Figura 4. Recuento de viabilidad de *E. coli* ATCC 25922, suspensión control (sin crioprotector)**

La suspensión con crioprotector que contiene a *K. oxytoca* ATCC 49131 da un porcentaje de viabilidad del 41.46% en la viabilidad final, mientras que para la suspensión sin glicerol se obtiene una viabilidad de 0.88%, dando una diferencia del 40.58% lo que nos hace ver un rango considerable de viabilidad entre las dos suspensiones, aproximadamente en el día 50 es cuando la suspensión control tiene un porcentaje similar al obtenido al final de los 180 días por la suspensión con crioprotector (Gráfica 3), esto también se demuestra con la Figura 5 y 6 donde se observa la diferencia en el crecimiento de las colonias, en la placa con crioprotector en la dilución  $10^{-5}$  y en la suspensión control en la dilución  $10^{-3}$ . Se puede observar en el Cuadro 5 que no hay variación significativa en las pruebas bioquímicas, por lo que no hay cambio en el metabolismo de las suspensiones de esta bacteria.

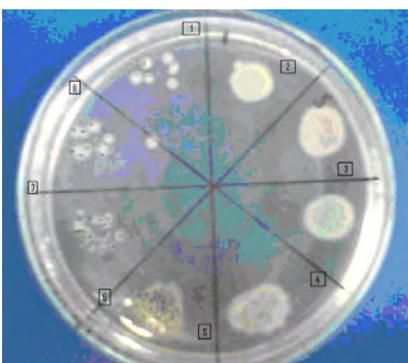


**Figura 5. Recuento de viabilidad de *K. oxytoca* ATCC 49131, suspensión con crioprotector.**

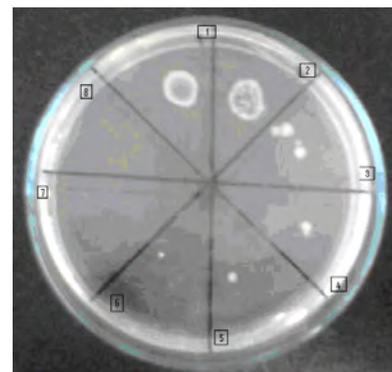


**Figura 6. Recuento de viabilidad de *K. oxytoca* ATCC 49131, suspensión control (sin crioprotector)**

Para la suspensión de *P. vulgaris* ATCC 49132 se observa un porcentaje de viabilidad final de la suspensión con glicerol del 52.27% con respecto a la suspensión sin crioprotector que es del 0.62%, lo que se hace evidente que en la suspensión control esta próxima al por ciento de viabilidad final de la muestra con crioprotector en el día 30, además la diferencia que existe es de 51.65%, Gráfica 4. Esto se puede observar claramente en la Figura 7 que muestra la placa de *P. vulgaris* con crioprotector crecimiento en la dilución  $10^{-6}$ , mientras que en la Figura 8 se ve el efecto adverso que ha sufrido la misma bacteria en la suspensión sin crioprotector. Además en el Cuadro 6 se hace notar que no hay variación significativa en las pruebas bioquímicas, por lo que se mantienen estables las bacterias.



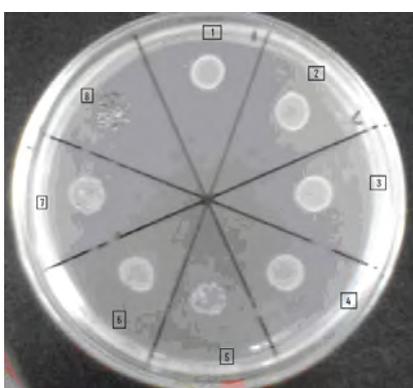
**Figura 7. Recuento de viabilidad de *P. vulgaris* ATCC 49132, suspensión con crioprotector.**



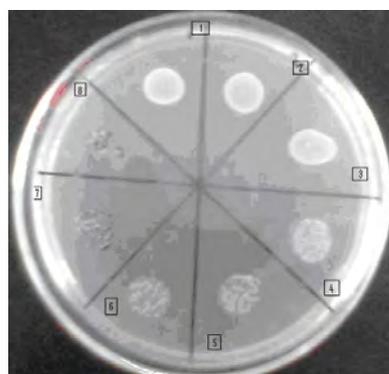
**Figura 8. Recuento de viabilidad de *P. vulgaris* ATCC 49132, suspensión control (sin crioprotector)**

Como se observa en las Figuras 9 y 10 de las placas de *S. epidermidis* ATCC 12228 el crecimiento de la suspensión control y de la suspensión muestra con

crioprotector se ven similares, pero en el cálculo del por ciento de viabilidad nos indica que después de 180 días en la suspensión con crioprotector hay 40% con respecto a lo inicial y para la suspensión control es de 6.78%, con una diferencia entre las dos muestras de 33.22% superior a la muestra con crioprotector, lo que es evidente en la suspensión control a los 90 días la viabilidad es similar al obtenido al final en la muestra con crioprotector, es decir que para la suspensión control a la mitad del muestreo hay un porcentaje similar al obtenido por la suspensión con crioprotector, como lo podemos ver en la Gráfica 5. En las pruebas bioquímicas se pueden observar en el Cuadro 7, en donde no hay cambios significativos en las pruebas iniciales con respecto a las finales.



**Figura 9. Recuento de viabilidad de *S. epidermidis* ATCC 12228, suspensión con crioprotector.**



**Figura 10. Recuento de viabilidad de *S. epidermidis* ATCC 12228, suspensión control (sin crioprotector)**

Mientras tanto para *S. epidermidis* ATCC 49461 se obtuvo una viabilidad del 42.19% para la suspensión con crioprotector y para la suspensión sin crioprotector del 6.89%, esto es una diferencia de 35.3%, además haciendo una comparación entre el por ciento de la viabilidad de la suspensión con crioprotector al final del estudio con respecto a un porcentaje de viabilidad de la suspensión control esta debe estar en los 80 días de haber empezado el estudio para tener una viabilidad aproximada (Gráfica 8). Por otro lado otra diferencia que se puede observar es en la Figura 11 que muestra la placa de la suspensión con crioprotector como hay crecimiento en la dilución  $10^{-8}$ , mientras que en la Figura 12 se ven suficientes colonias para ser contadas en la dilución  $10^{-7}$  en la suspensión bacteriana sin crioprotector. Además, en las pruebas bioquímicas que tienen por objetivo probar que la bacteria no presente cambios en su estabilidad, en el Cuadro 8 donde no se ven cambios con respecto al inicio y al final del muestreo.

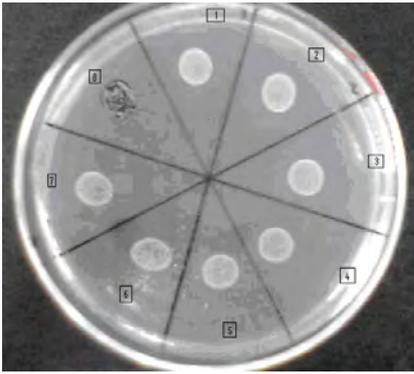


Figura 11. Recuento de viabilidad de *S. epidermidis* ATCC 49461, suspensión con crioprotector.

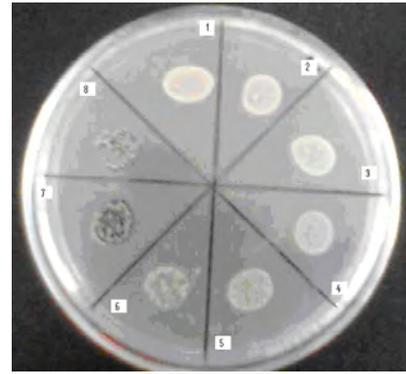


Figura 12. Recuento de viabilidad de *S. epidermidis* ATCC 49461, suspensión control (sin crioprotector)

En la Gráfica 7 que pertenece a la bacteria *S. agalactiae* ATCC 13813 se obtuvo una viabilidad para la suspensión con crioprotector del 36.96% y un porcentaje de viabilidad del 1% para la suspensión sin crioprotector, donde la diferencia es del 35.96% entre las dos suspensiones del *S. agalactiae*. En las Figuras 13 y 14 es evidente que las colonias contadas aparecen en las concentraciones mas altas de las placas,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  respectivamente, por ello se ve la diferencia considerable entre los dos tipos de muestras, donde podemos observar que aproximadamente en el día 80 el por ciento de viabilidad calculada es similar a la viabilidad obtenida por la suspensión con crioprotector al final del estudio. Otro punto que analizar es el de las pruebas bioquímicas que se presentan en el Cuadro 9 al final del muestreo no hay cambios en la actividad metabólica con respecto a las pruebas iniciales.

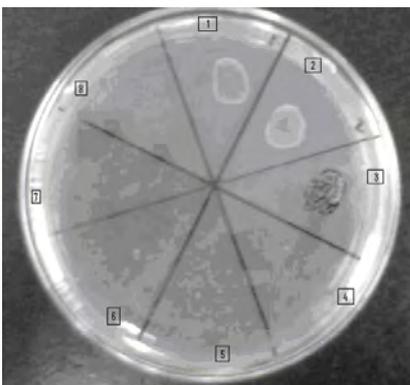


Figura 13. Recuento de viabilidad de *S. agalactiae* ATCC 13813, suspensión con crioprotector.

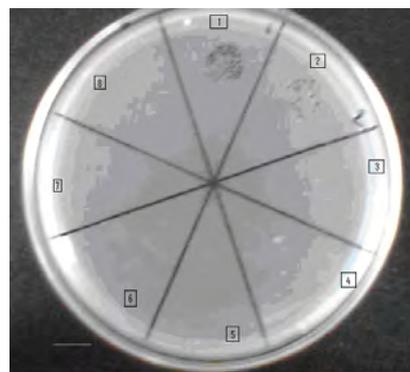


Figura 14. Recuento de viabilidad de *S. agalactiae* ATCC 13813, suspensión control (sin crioprotector)

Es muy importante notar la diferencia que se marca en los resultados con respecto a la diferencia que hay entre las suspensiones con crioprotector y las muestras control, es donde se puede demostrar la eficiencia que tiene el crioprotector para mantener a las células viables, este ayuda a las células a resistir y minimizar el daño celular que se produce en el proceso de congelación. Además se observa que gracias a este agente las células pueden ser recuperadas en un lapso de tiempo más prolongado, ya que ninguna suspensión sin el agente crioprotector presentó un mayor valor en su porcentaje de viabilidad en la mitad del tiempo con respecto al los valores finales de las suspensiones con el agente crioprotector. En otras palabras mientras que para las muestras con glicerol se puede mantener una viabilidad confiable en un lapso de tiempo de 180 días o más, las muestras sin el crioprotector pueden dar una viabilidad óptima antes de los 90 días.

Uno de los objetivos en que se basó el estudio no solo fue conseguir el mantener la viabilidad en condiciones óptimas a las bacterias congeladas, sino además que estas no presentaran cambios significativos en su estructura y bioquímica, por lo que se realizaron tinciones de Gram a las bacterias después de cada muestreo de las placas donde se realizaban el conteo de UFC, con la cual se verificó que las células seguían sin cambios estructurales y presentaban una morfología microscópica acorde a lo expresado por la bibliografía.

Un factor importante que influyó en la viabilidad de las suspensiones bacterianas fueron los ciclos repetidos de congelación y descongelación que son mucho más destructivos para las bacterias que una conservación prolongada a temperaturas de congelación, esto porque sería una respuesta de la reducción en la viabilidad de las suspensiones bacterianas utilizadas ya que pasaron por estos ciclos al hacer la toma de muestra, aunque cada vez que se abría el criotubo se tomaban precauciones para que la suspensión no se descongelara completamente y aumentara el daño celular, ocurría una descongelación parcial dentro del criotubo.<sup>36</sup>

Las bajas temperaturas por si mismas no matan los microorganismos, de hecho solo se utilizan para impedir su desarrollo durante un período limitado de tiempo. Cuanto mas baja sea la temperatura de congelación, se prolongara mas el tiempo de vida

en las células sin cambio en su estabilidad genética, por lo tanto el método de congelación a -20 °C nos proporciona una técnica de conservación óptima donde al disminuir el metabolismo de las células microbianas, garantiza la estabilidad evitando la aparición de variantes genéticas.<sup>14, 51</sup>

## IX CONCLUSIONES

Este método de conservación provee un resultado exitoso en la estabilidad de diferentes especies de bacterias, además la mayoría de las cepas estudiadas tienen un porcentaje de viabilidad óptima por lo que se puede interpretar que el método es efectivo para la conservación de cepas bacterianas y hay que mencionar que ninguna técnica de conservación resulta con un 100% de recuperación de las células conservadas.

Mientras tanto las pruebas bioquímicas que se realizaron a cada bacteria no mostraron cambios significativos en las pruebas bioquímicas de todas las bacterias estudiadas, lo que nos hace notar que es un método con resultados satisfactorios para la conservación de bacterias.

Entonces la conclusión es que con este método se asegura las características estructurales y metabólicas de las bacterias, no presenta variaciones genéticas, además, su costo es menor, utiliza menor espacio en su almacenamiento y la producción de sustancias de desecho es mínima. Por lo que su utilidad para el mantenimiento del cepario de la FES Zaragoza sería exitosa y de gran utilidad.

## X. PROPUESTAS

Este método logra un mejor aseguramiento en la pureza de las cepas bacterianas, esto es que se pueden utilizar dos diferentes métodos de conservación al mismo tiempo, por ejemplo, nuestros cultivos pueden estar congelados a -20 °C y también en agar inclinado con sus resiembras periódicas. Esto se haría para hacer más confiables nuestros resultados en las prácticas de laboratorio, ya que mientras utilizamos cepas conservadas en transferencia periódica, tendríamos cepas congeladas a -20 °C, sin riesgo de contaminación y en caso donde se tuviera alguna discrepancia en los resultados de las cepas de transferencia periódica se podrían analizar con la muestras conservadas a -20 °C.

Con la ayuda de esta técnica se podrá implementar a más grupos de microorganismos en el que debe considerarse las características metabólicas para obtener la adecuada suspensión en donde se congelaran las bacterias.

## REFERENCIAS

1. Boone D, Caztenholz R, Carrity G. Bergey's of systematic Bacteriology. Vol. 1. 2ª edición. New York, EU: Springer; 2001.
2. Prescott CS. Industrial microbiology. Westport, Connecticut: Avi Publishing. Company Inc; 1982.
3. Weng AZ, Junco DA, Díaz RE, Álvarez MI. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Revista Cubana Higiene y Epidemiología. 2005; 43(2).
4. Collins C. Métodos microbiológicos. Zaragoza, España: Acribia; 1989.
5. De Paoli. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29 (5): 897-910.
6. Jawetz ED, Meink JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 15ª edición. México: Editorial el manual moderno; 1996.
7. Pelczar MD, Chairman RC, Jennison MW and Burnett GW. Manual of microbiological methods. USA: Mc Graw-Hill; 1957.
8. Thoma RW. Benchmark Paper in microbiology, industrial microbiology. Vol. 12. Inc. Pennsylvania. USA: Editorial Dowden, Hutchinson & Ross; 1977.
9. Smith D. Culture collections over the world. Inter Microbiol. 2003; 6 (2): 95–100.
10. Kieslich K. Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds. Berlin: John Wiley & sons Georg Thieme Publishers; 1976.
11. Forbes BA, Sahm DF, Weisfeld AS. Bailey & Scott, diagnóstico microbiológico. 11ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2002.
12. Hill LR, Kirsop BE. Living resources for biotechnology: Bacteria. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
13. Black JG, Microbiology, principles and applications, 3ª edición. New Jersey; 1996.
14. Ingraham LJ. Introducción a la microbiología. 1ª edición. Barcelona: Editorial Reverte; 1998.
15. Madigan TM, Brock DT. Microbiología. 6ª edición. México: Prentice Hall Hispanoamérica SA; 1993.
16. Stanier YR. Douroroff MJ, Adelberg AE. Microbiología. 4ª edición. México: Editorial Repla; 1986.

17. Brock DT. Biología de los microorganismos. 2ª edición. Barcelona: Ediciones Omega; 1988.
18. Bohumil S. Methods in industrial microbiology. England: Editorial Ellis Horwood Limited; 1983.
19. Hunter-CJ., Belt A. Maintaining cultures for biotechnology and industry. California, USA: Edit. Academic Press; 1996.
20. Daily WA, Higgs CE. Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid Nitrogen. *Cryobiology*. 1973; 10: 364- 367.
21. Kunz B. Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 1983.
22. Romero RC. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, 3ª edición. México: editorial Panamericana; 2007.
23. Medealy P and O'Connor R. General Procedures for cell culture. USA: Elsevier Science; 2006.
24. John G. Day, Mark R. McLellan. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Totowa, New Jersey: Editorial Humana Press; 1995.
25. Grainger JM, Lynch JK. Microbiological methods for environmental biotechnology. London: Academic Press. Inc; 1984.
26. Demain AL., Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2ª edición. Washington, USA: ASM Press; 1999.
27. Morgan CA, Herman N, White PA and Vesey G. Preservation of microorganisms by drying. *J Microbiological Methods*. 2006; 66 (2):183-193.
28. Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1971; 8:137-138.
29. Karow AM, Critser JK. Reproductive tissue banking. Scientific principles. London: Academic Press; 1997.
30. Arias RS. Criopreservación, bases físico-químicas, diferencias entre congelación rápida y controlada, control de calidad. [Tesis Licenciatura]. México, DF. UNAM; 2001.
31. McGann LE. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1978; 8: 489- 498.
32. Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J y Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiological Methods*. 2004; 58 (1): 31-38.

33. Jeannin AM. Ingeniería farmacéutica. México DF: Editorial El manual Moderno; 1986.
34. Wowk B, Fahy GM. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology*. 2002; 44 (1): 14- 23.
35. Khursheed AM. Preservation of *Chloroflexus* by deep-freezing and liquid-drying methods. *J Microbiological Methods*. 1998; 32 (1): 73-77.
36. Joklik WK. Zinsser. Microbiología, 20ª edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1994.
37. Pelczar MD, Chairman RC, Jennison MW and Burnett GW. Manual of microbiological methods. USA: Mc Graw-Hill; 1957.
38. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico, 5ª edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999.
39. Collins CH. Métodos microbiológicos. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.; 1989.
40. Davis BD. Microbiology, 3ª edición. Philadelphia: Flarper & Row publishers; 1980.
41. Murray PR, Lawrence WD. Microbiología médica. Barcelona: Editorial Mosby; 1992.
42. McFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ª edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2003.
43. Finegold SM, baron EJ. Bailey & Scott's. Diagnostic microbiology. 7ª edición. St Louis: The Mosby Company; 1989.
44. Tequianes BL. Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. [Tesis Licenciatura]. Cd. de México: FES Zaragoza, UNAM; 2001.
45. Lennette EH. Manual de microbiología clínica. 4ª edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1987.
46. Baker FJ, Breach MR. Manual de técnicas de microbiología médica. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.; 1990.
47. Jiménez MR. Evaluación de dos métodos de conservación a largo plazo para bacterias microaerofílicas estrictas de importancia médica. [Tesis Licenciatura]. Cd. de México: FES Zaragoza, UNAM; 2005.
48. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*. 2002; 20: 5- 13.

49. Grainger JM. Microbiological methods for environmental biotechnology. London: Academic Press Inc.; 1989.
50. Dan M, Richardson J, Miliotis MD. Comparison of preservation media and freezing conditions for storage of specimens of faeces. *The Journal of Medical Microbiology*, 28 (2): 151-154.
51. García LD, Urubu FF. Colección española de cultivos tipo CECT. España, Universidad de Valencia: 2003.