



**INEI**  
Instituto Nacional de  
Enfermedades Infecciosas  
"Dr. Carlos G. Malbrán"



**ANLIS  
MALBRÁN**  
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS  
E INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

# MANUAL DE PRESERVACIÓN DE BACTERIAS

**Prieto Mónica, Claudia Martínez, Dangiolo Gastón**

**INEI, BACTERIOLOGÍA ESPECIAL**

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, JUNIO DE

2020

CITA RECOMENDADA:

Prieto M, Martínez C, Diangolo G. Manual de preservación de bacterias. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), 2020.

Disponible en:

<http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/1634>

**“Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS”.**



[Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. DEFINICIONES	5-6
3. MANIPULACIÓN DE LAS CEPAS DE REFERENCIA	6-8
4. MÉTODOS DE PRESERVACIÓN	8
4.1. Métodos de preservación a corto plazo	8
Subcultivos periódicos	9-10
Inmersión en aceite mineral	10
Congelamiento a $-20^{\circ}\text{C}$	10-11
Desecación	12
4.2. Métodos de preservación a largo plazo	12
Ultracongelación	13
Agentes crioprotectores	13
Preparación de crioprotectores	14
Viales para preservación a ultra bajas temperaturas	14-15
Preparación del cultivo para criopreservar	15-17
Recuperación de cultivos preservados a temperaturas ultra bajas	17-18
Liofilización	18
Liofilizadores de cámara (stopering)	18
Liofilizadores de erizo	19
Viales	19
Cerrado y almacenamiento del producto liofilizado	19
Medios soporte y preparación del cultivo	19
Reconstitución de cultivos liofilizados	20
5. BIBLIOGRAFÍA	20-22

## 1. INTRODUCCIÓN

La investigación y el desarrollo de métodos de preservación de microorganismos para su posterior estudio y/o utilización, comenzó a fines del siglo XIX, cuando la supervivencia de bacterias en hielo fue documentada por primera vez [1].

A partir del siglo XX, los microbiólogos desarrollaron distintos métodos de preservación de microorganismos [2] y de esta forma surgió el concepto de colecciones de cultivo, como herramienta valiosa para la investigación científica, el estudio de la biodiversidad, la investigación epidemiológica y la industria.

Los microorganismos han sido históricamente empleados en la producción de medicamentos, en la producción de alimentos y en la elaboración de reactivos, entre otras aplicaciones. También han sido implementados como agentes biorremedadores para la protección ambiental y su utilización ha incrementado con el avance de la biotecnología [3]. Estas aplicaciones han fortalecido la necesidad de preservar y mantener los cultivos microbianos de manera tal que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables a lo largo del tiempo [4, 5].

Por otro lado, la continua expansión del mercado, con una acelerada proliferación de normas y ensayos analíticos, han requerido la implementación de sistemas de gestión de calidad en laboratorios de análisis microbiológicos para asegurar la trazabilidad de los resultados que se generan. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben utilizar cepas de referencia obtenidas directamente de una colección de cultivos microbianos nacional o internacional reconocida, cuando éstas existan. Alternativamente, se pueden emplear derivados comerciales para los cuales el laboratorio ha demostrado la equivalencia de todas las propiedades relevantes en el punto de uso [6].

La Norma ISO 17025 contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios para demostrar que disponen de un sistema de gestión de calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de producir resultados técnicamente válidos. La acreditación de métodos de ensayo en microbiología, requiere cepas de referencia [7].

## 2. DEFINICIONES

**Aislamiento:** población de células microbianas recuperadas de una única colonia cuyas características fenotípicas y genotípicas no han sido definidas al nivel necesario para otorgarle la categoría de CEPA.

**Cepa:** población de células microbianas de origen conocido, con características fenotípicas y genotípicas definidas, identificado por lo menos al nivel de género y especie.

**Cepa tipo:** cepa que corresponde a la primera descripción y caracterización taxonómica de una nueva especie. Son establecidas por los subcomités internacionales de taxonomía.

**Cepa de referencia:** Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, de origen conocido, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivos (CC) o Centro de Recursos Biológicos (CRB), catalogados y descritos según sus características, que se utilizan para fines comparativos. Las cepas de referencia podrán ser subcultivadas una vez del cultivo original, para obtener cepas de reserva, realizando en paralelo los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Norma ISO 17025, apartado 5.6.3. [7].

**Cepas de reserva o cultivos de reserva:** Primer subcultivo o pasaje de una cepa de referencia suministrada por el proveedor o que procedan directamente del proveedor como tales.

**Cepas de trabajo Cultivo de trabajo (cultivo de uso):** Primer subcultivo obtenido de una cepa de reserva. Son los cultivos que se utilizan en la rutina diaria (por ejemplo: controles de calidad internos)

**Cepas comerciales:** cepas suministradas por casas comerciales diferentes de las CC o CRB, y que pueden o no proceder de una colección de cultivos.

**Cepas salvajes:** No proceden de CC ni de BRC.

**Ensayo de Homogeneidad o Control de calidad post preservación:** Es el control de calidad de los lotes de cepas preservadas a fin de comprobar su homogeneidad. Incluye control de viabilidad, pureza e identidad y se realiza inmediatamente después de finalizado el procedimiento de preservación

**Ensayo de Estabilidad o Control de calidad durante el almacenamiento:** Se realiza durante el almacenamiento de los cultivos preservados. Incluye control de viabilidad, pureza e identidad.

**Ensayo de Identidad:** Reconocimiento del género y la especie taxonómica del microorganismo mediante estudios morfológicos, bioquímicos, serológicos, proteómicos, moleculares u otros que permitan diferenciarlo de otros microorganismos.

**Repique o subcultivo o pasaje:** transferencia de un inóculo de células de un medio de cultivo a otro medio fresco refiere a cada siembra de una cepa o aislamiento en medio de cultivo fresco.

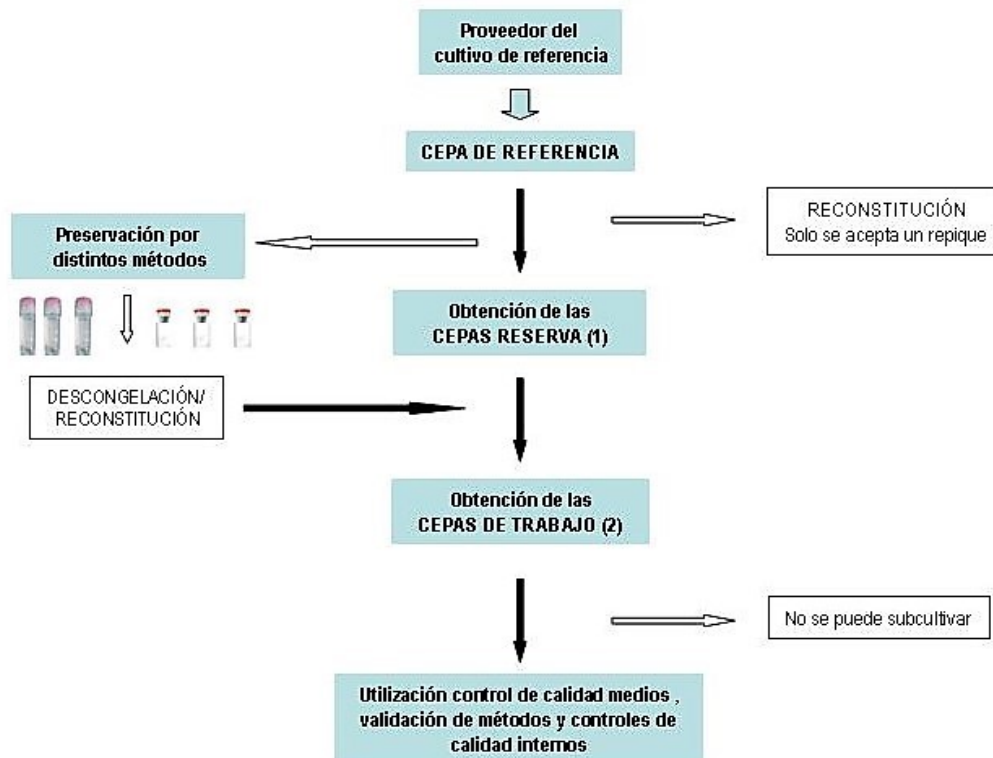
### 3. MANIPULACIÓN DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

Las cepas de referencia deben ser reconstituidas siguiendo las instrucciones del proveedor. El proveedor debe entregar el material junto con la documentación que incluya número de pasaje, lote, protocolo para reconstituir el cultivo (en función del tipo de presentación), el medio de cultivo a emplear y las condiciones de incubación. A partir de las cepas de referencia suministradas por las CC o CRB, se obtienen las cepas de reserva (primer subcultivo), y de éstas se obtienen las cepas de trabajo (segundo subcultivo). Figura 1.

Los cultivos suministrados por el proveedor tienen que cumplir 3 requisitos:

- Pureza: ausencia de contaminación.
- Autenticidad: género y especie determinados por métodos de referencia.
- Estabilidad: Mínimo número de pasajes o repiques.

**Figura 1: Cepas de referencia, reserva y trabajo [6]**



**Pasaje 1:** ATCC define el primer pasaje como el primer caldo o cultivo en agar obtenido del vial provisto por ATCC

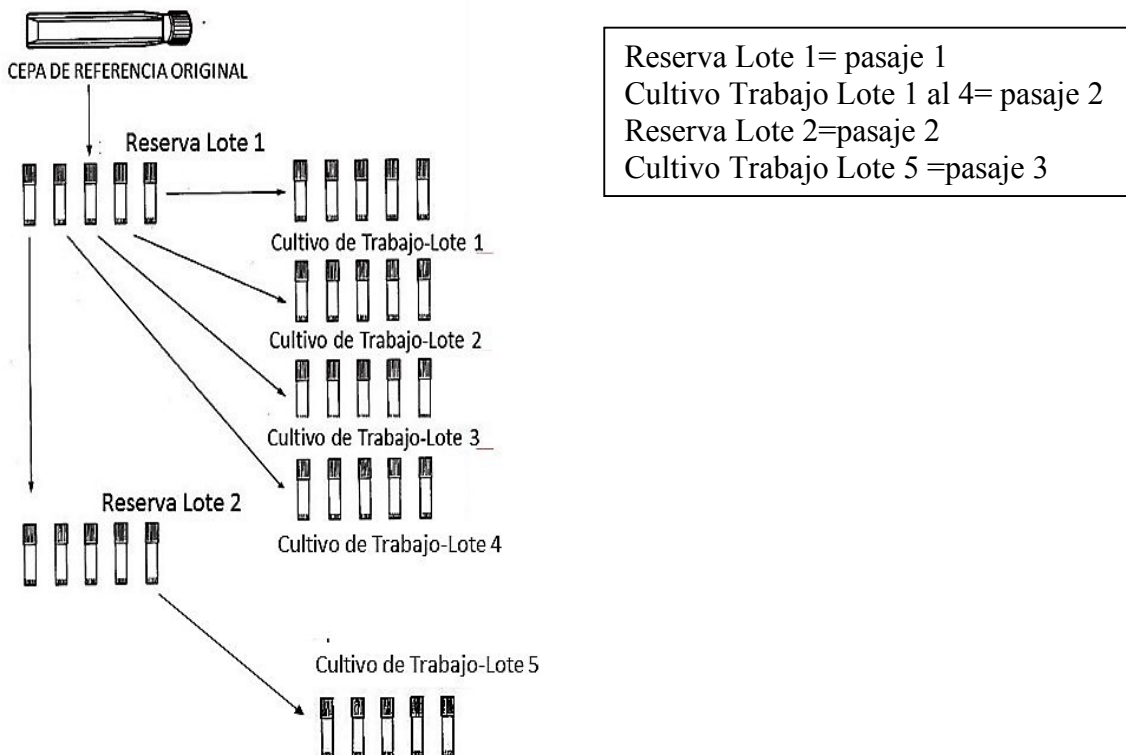
➡ : Subcultivo

(1): Controlar pureza e identidad; (2) controlar pureza e identidad y registrar número de lote

El laboratorio receptor de la cepa de referencia debe realizar solo un subcultivo para producir los cultivos de reserva. Se deben realizar chequeos de pureza y autenticidad en forma paralela según correspondan. Se recomienda almacenar los cultivos de reserva en alícuotas congeladas o liofilizadas. Los cultivos de trabajo para el uso rutinario deben ser subcultivos primarios de los cultivos de reserva. Si los cultivos de reserva han sido descongelados, no deben volver a congelarse ni reutilizarse. El laboratorio debería planificar y organizar un cronograma de utilización de cultivos de trabajo para poder calcular el número de viales de cultivo de reserva que deberá producir al reconstituir y subcultivar la cepa de referencia. Los cultivos de trabajo no deberían ser subcultivados. Generalmente, no pueden ser utilizados más de cinco repiques (o pasajes) de la cepa de referencia original en un método estándar. En aquellos casos que se utilicen cepas con más de 5 repiques, el laboratorio debería proveer pruebas documentales de que no ha habido cambio en ninguna propiedad relevante. Los derivados comerciales de las cepas de referencia sólo pueden ser usados como cultivos de trabajo.

En la figura 2 se muestra un esquema probable para el procesamiento y almacenamiento de cepas de referencia y sus respectivos lotes de reserva y de trabajo [10].

**Figura 2: Protocolo de procesamiento de cepa de referencia. Esquema adaptado de Hay y col. [10].**



## 4. MÉTODOS DE PRESERVACIÓN

Existen numerosos métodos descriptos para la preservación de microorganismos. La preservación y almacenamiento efectivos se definen como la capacidad de mantener un microorganismo viable, libre de contaminación y sin cambios en sus características fenotípicas y genotípicas. Así mismo, el microorganismo debería ser fácilmente reconstituido a su condición previa al proceso de preservación. Los métodos óptimos para la preservación dependen del tipo de microorganismo. Los métodos se dividen en métodos de corto y largo plazo, de acuerdo a la capacidad de mantener la estabilidad y viabilidad de cada uno de ellos. Este capítulo está enfocado en la descripción de métodos de conservación para la preservación de bacterias.

### 4.1. MÉTODOS DE PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO

#### Subcultivos periódicos

El método más simple para mantener la viabilidad de los microorganismos durante un corto plazo es el subcultivo periódico a medios de cultivo frescos. Si los microorganismos desean preservarse por períodos mayores a una semana, este simple método se transforma en un método laborioso, que requiere amplios espacios de almacenaje y puede afectar la estabilidad de las cepas.

Cada subcultivo o pasaje aumenta la probabilidad de mutaciones que pueden expresarse en cambios fenotípicos no deseados. Si las características que interesan preservar están codificadas en plásmidos, este método no es recomendable dado que los microorganismos pueden perder los elementos genéticos móviles durante los subcultivos.

El intervalo entre subcultivos o pasajes, requeridos para mantener la viabilidad, varía de acuerdo al tipo de microorganismo. La frecuencia de mutaciones está asociada a las características del genoma y también dependerá del tipo de microorganismo [11]. Algunos organismos se mantienen estables indefinidamente mientras que otros muestran cambios fenotípicos luego de dos o tres pasajes. Por lo tanto, la elección de este método de preservación requiere conocer las características particulares del microorganismo, establecer el medio de cultivo adecuado, las condiciones de almacenamiento y la frecuencia de pasajes.

Los medios de cultivo recomendados son aquellos que permitan la supervivencia del microorganismo pero minimicen los procesos metabólicos y disminuyan la velocidad de crecimiento. Un medio con muy pocos nutrientes puede representar un ambiente hostil para el microorganismo y estimular procesos de adaptación a través de mutaciones. Un medio de cultivo muy nutritivo permite una mayor velocidad de replicación y los pasajes



necesarios para mantener la viabilidad deberán ser más frecuentes. Por lo tanto, no es posible establecer un medio de cultivo y frecuencia de repique óptimos universales, ya que dependerán de la especie a preservar e inclusive, de las características particulares de una cepa individual. Los medios usualmente utilizados son: agua destilada estéril (*Pseudomonas* spp.), caldo o agar tripticasa de soya u otros caldos nutritivos. El buffer fosfato, PBS, (composición: pH 7·2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15·44  $\mu\text{M}$ ; NaCl, 1·55 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27·09  $\mu\text{M}$ ), ha demostrado ser un buen soporte de mantenimiento para varias especies de bacterias gram positivas y gram negativas, que mantienen su viabilidad asegurada hasta 30 semanas [12]. Esta metodología requiere cultivar el microorganismo en placas con medios sólidos nutritivos y condiciones óptimas de incubación hasta fase estacionaria temprana y luego suspender todo el desarrollo en tubos con 10 ml de PBS (2 o 3 tubos por cepa), que deben ser sellados herméticamente y almacenados en oscuridad a temperatura ambiente (20°C-25°C).

Con respecto a las condiciones de almacenamiento, muchos laboratorios utilizan medios sólidos como agar tripticasa de soya en tubos en pico de flauta y los mantienen en las mesadas de trabajo a temperatura ambiente. Esta práctica provoca una rápida deshidratación de los medios de cultivo con la consecuente pérdida de viabilidad de los microorganismos. Se recomienda asegurar un cierre hermético de los tubos, como por ejemplo, utilizar tapa a rosca y sellar con parafina o *parafilm*. El almacenamiento deberá realizarse en un lugar alejado de la luz entre 5°C y 8°C, para disminuir los procesos metabólicos y asegurar la viabilidad por períodos más prolongados.

Cada laboratorio debe ensayar las condiciones y la frecuencia de pasajes para los microorganismos que desea preservar, de forma tal de identificar los intervalos adecuados de subcultivo y las mejores condiciones de almacenamiento. Es importante tener en cuenta, que cuando se realiza el subcultivo de una cepa, es conveniente seleccionar de 5 a 10 colonias para disminuir la probabilidad de propagar una población con características genotípicas o fenotípicas alteradas. En general, si no se trata de microorganismos fastidiosos, se sugiere una frecuencia de subcultivo de 2-3 semanas, si se mantienen refrigerados (4°C).

### **Inmersión en aceite mineral**

Esta alternativa es sencilla y efectiva, principalmente para la preservación de hongos y bacterias aerobias esporuladas. Consiste en cubrir el cultivo con una capa de aceite mineral o vaselina. Este método puede mantener la viabilidad por períodos de hasta 3 años sin necesidad de subcultivos. Los microorganismos se mantienen metabólicamente activos por lo tanto, pueden ocurrir mutaciones, sin embargo la probabilidad es muy baja. El aceite mineral utilizado debe ser de grado medicinal y estéril para evitar contaminaciones. El aceite mineral no puede ser autoclavado y debe esterilizarse por calor seco a 170° por 1-2 horas. El cultivo debe prepararse inoculando 5 a 10 colonias de la cepa a preservar, en tubo pico de flauta con medio de cultivo sólido o en tubo con 10 ml de caldo nutritivo. La incubación debe realizarse a temperatura óptima y una vez detectado el desarrollo, se

añade en forma aséptica una capa de aceite mineral o vaselina estéril hasta cubrir el cultivo para evitar la deshidratación. Para bacterias anaerobias esporuladas, se utilizan tubos con una columna de aproximadamente 10 ml de agar nutritivo. Los tubos con agar deben fundirse a baño maría a 100°C y mantener a esa temperatura por 15-20 minutos para lograr eliminación del oxígeno. Una vez fundido y desoxigenado, el tubo con agar se enfría a 50°C y se realiza la inoculación del cultivo. La siembra debe realizarse a partir de un cultivo en fase estacionaria temprana. Se recoge una ansada completa (si el medio es sólido) o se toman 100 ul (si el medio es líquido) y se depositan en el fondo del tubo con agar fundido a 50°C. El tubo con el cultivo se enfría rápidamente hasta solidificación del agar y se añade en forma aséptica una capa de aproximadamente 2 centímetros de aceite mineral estéril. Es importante evitar la introducción de burbujas de aire que puedan quedar atrapadas entre el medio y la capa de aceite. El tubo inoculado se incuba en aerobiosis por 24-48 horas hasta visualizar turbidez del agar en la parte inferior de la columna (desarrollo bacteriano en condiciones anaeróbicas) y luego se mantiene a temperatura ambiente. Si el laboratorio utiliza este método, deberá realizar pruebas de viabilidad para establecer la frecuencia óptima de subcultivos [13].

### **Congelamiento a -20°C**

Este método es utilizado por muchos laboratorios para preservar microorganismo por períodos mayores que el método de subcultivo periódico. Los cultivos de ciertas especies logran mantenerse viables hasta 1 año, pero en general, la viabilidad se pierde en un periodo de 30 días debido al daño celular causado por la formación de cristales de agua y las fluctuaciones de electrolitos. Es importante evitar la utilización de *freezers* con períodos automáticos de congelamiento-descongelamiento.

El medio de soporte más ampliamente utilizado es el caldo tripticasa de soya y es conveniente la utilización de crioprotectores como el glicerol. La concentración final de glicerol recomendada es 10% V/V. También puede utilizarse leche descremada (*skim milk*) en concentración de 10% p/v. El cultivo debe prepararse inoculando 5 a 10 colonias de la cepa en medio nutritivo sólido o caldo nutritivo, incubar en atmósfera y temperatura óptimas y una vez evidenciado el desarrollo microbiano, se realiza una suspensión con inóculo denso (mayor a  $10^8$  UFC/ml) en viales con 1-2 ml de medio soporte. En la Tabla 1 se detallan períodos de almacenamiento a -20°C de algunos grupos bacterianos [14].

Los períodos de tiempo descriptos pueden variar entre distintas especies e inclusive entre cepas individuales. Cada laboratorio debería evaluar periódicamente, la viabilidad de sus cultivos preservados a -20°C para establecer un protocolo de preservación adecuado al tipo de microorganismo utilizado.

**Tabla 1: Condiciones de preservación por congelamiento a -20°C de distintos grupos bacterianos**

Grupo	Medio soporte	Duración	Observaciones
Estreptococos	Leche descremada CTS +Gli 10%	2 meses	<i>S. pneumoniae</i> y los estreptococos del grupo viridans, son de difícil mantenimiento. Se mantienen viables a -20°C por 1 mes, suspendiendo cultivos frescos en leche descremada estéril
Bacterias aerobias esporuladas	CTS + Gli 10%	1-2 años	
Bacterias aerobias gram positivas	CTS + Gli 10%	1-3 años	
Bacterias aerobias gram negativas	CTS + Gli 10%	1-2 años	<i>Shigella</i> spp, <i>Vibrio</i> spp. y complejo <i>Burkholderia cepacia</i> pierden muy rápidamente la viabilidad
Micobacterias	Leche descremada	3-5 años	
Bacterias exigentes nutricionales o de lento desarrollo	CTS + Gli 10%	15-30 días	Ej. <i>Haemophilus</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., <i>Actinobacillus</i> spp., grupo HACEK.
Bacterias anaerobias no esporuladas	No recomendado		

CTS:caldo tripticasa de soya; Gli: glicerol

## Desecación

Estos métodos se basan en detener el crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible en la célula en un soporte inerte y estéril. Los cultivos bacterianos se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda (para bacterias halófilas) [15].

Durante la desecación, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua, razón por la cual el número de células viables disminuye notablemente, especialmente para microorganismos sensibles. La mayoría de los microorganismos no sobreviven la desecación por periodos mayores a unos pocos días, sin embargo algunas bacterias esporuladas pueden ser preservadas en discos de papel. El cultivo debe prepararse inoculando 5 a 10 colonias en un caldo nutritivo hasta obtener una suspensión de  $10^8$  UFC/ml, que es inoculada en discos de papel de filtro. Los discos son secados a temperatura ambiente o en cámara de vacío y distribuidos en viales. Estos viales se incuban en lugar oscuro a 4°C o -20°C. Los microorganismos pueden mantenerse viables hasta 4 años [16]. Para reconstituir el cultivo, se toma un vial con discos del refrigerador o freezer y se deja a temperatura ambiente por 15 minutos para estabilizar la temperatura. Luego, se retira un disco con pinza estéril y se coloca sobre una placa con medio nutritivo sólido o líquido adecuado para el microorganismo en cuestión. Se incuba a temperatura óptima y debe controlarse la pureza e identidad previamente a su utilización.

## 4.2. MÉTODOS DE PRESERVACIÓN A LARGO PLAZO

Los métodos recomendados para preservar microorganismo por períodos mayores a dos años son la criopreservación o ultracongelación y la liofilización. Aunque la inversión inicial para adquirir el equipamiento (unidades eléctricas de ultra baja temperatura, tanques de nitrógeno líquido, liofilizadores) es significativa, esta metodología es menos laboriosa, más efectiva, requiere menos espacio para el almacenamiento y principalmente reduce significativamente la probabilidad de ocurrencia de mutaciones, aunque ha sido documentada la pérdida de elementos genéticos móviles durante el almacenamiento a temperaturas de -80°C [17, 18].

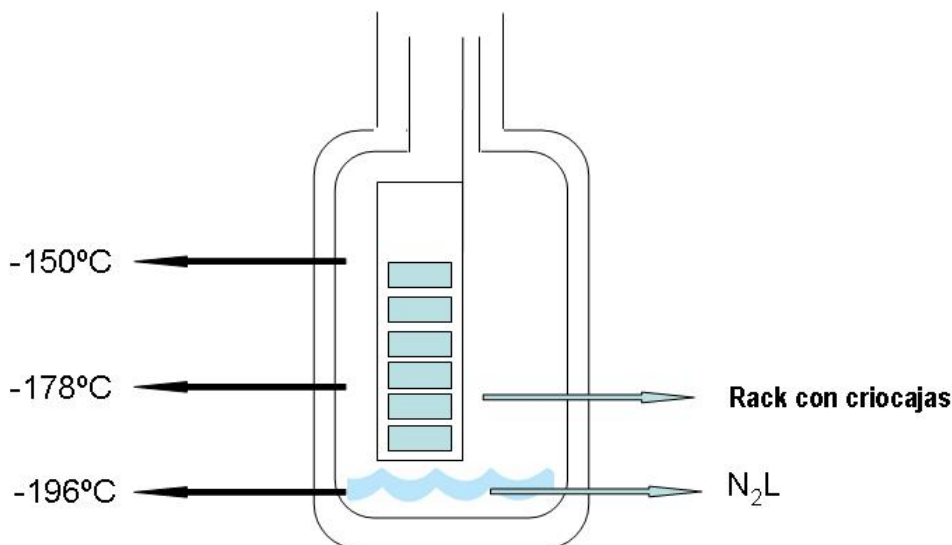
Durante la criopreservación y la liofilización, las células microbianas son expuestas a temperaturas de congelamiento que promueven la formación de cristales de hielo tanto en la suspensión como dentro de las células, provocando un desequilibrio osmótico que induce cambios bioquímicos y físicos, como por ejemplo, la ruptura de membranas celulares que lleva a muerte celular. Para proteger a los microorganismos del daño producido durante el proceso de congelamiento, liofilización y descongelamiento, se añaden a la suspensión del cultivo, agentes químicos denominados crioprotectores (criopreservación) o lioprotectores (liofilización).

Aunque los métodos de ultracongelación y liofilización han demostrado buenos resultados en términos de viabilidad y mantenimiento de la integridad genética, aún es necesario profundizar la optimización de protocolos, condiciones, y uso de otros agentes crioprotectores o lioprotectores con un grupo más diverso de microorganismos.

## Ultracongelación

Es el método de elección para preservación de microorganismos por períodos prolongados. Los sistemas para alcanzar estas temperaturas son las unidades eléctricas de ultra baja temperatura, denominados *ultrafreezer* (-80°C) o las unidades de almacenamiento con nitrógeno líquido (-196°C -150°C), denominadas tanques de nitrógeno líquido. Estas bajas temperaturas previenen la desnaturalización y el daño de las proteínas y del ADN celular. El movimiento del agua intracelular disminuye y de esta forma, el metabolismo celular es prácticamente detenido y así las células se mantienen viables por períodos prolongados de tiempo. La preservación a -80°C es adecuada pero -196 °C es considerada la temperatura ideal porque las probabilidades de mutaciones a esta temperatura son casi cero [19]. Durante la criopreservación en nitrógeno líquido los viales pueden almacenarse sumergidos en nitrógeno (-196 °C) o en su fase gaseosa (-150°C a -178°C). El almacenamiento en fase gaseosa se considera mejor para evitar el ingreso de nitrógeno líquido al interior del criovial y de esta forma prevenir explosiones y contaminación viral. Figura 3.

**Figura 3: Temperaturas en sistemas de almacenamiento (tanques), de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L)**



## Agentes crioprotectores

Existen dos clases de agentes crioprotectores: aquellos que no son penetrantes y aquellos que penetran la célula microbiana. Los crioprotectores penetrantes son los recomendados, éstos disminuyen el punto de congelación del agua, promueven la formación de puentes hidrógeno y la vitrificación de solventes y de esta forma se previene la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. El crioprotector ideal es aquel que es altamente

soluble en agua, penetra el interior de la célula, no es reactivo y no precipita a altas concentraciones.

Los agentes crioprotectores penetrantes más ampliamente utilizados son el glicerol (concentración 10-15% v/v) y el Dimetil sulfoxido, DMSO) (concentración 5-10% v/v).

El DMSO tiene mayor capacidad penetrante a bajas temperaturas, sin embargo, dada su toxicidad a altas concentraciones, generalmente se utiliza glicerol. Entre los crioprotectores no penetrantes, los más ampliamente utilizados son: leche descremada (*skim milk*), sacarosa, lactosa, glucosa, sorbitol y manitol [4].

Algunos investigadores han documentado que la leche descremada (concentración 10% p/v) es mejor crioprotector que el glicerol (15%) en caso de fallas eléctricas en los *ultrafreezer*, ya que mantuvo la viabilidad por períodos mas prolongados después de períodos largos de descongelamiento. La leche descremada podría afectar la composición de ácidos grasos de la membrana celular, por lo tanto alteraría la fluidez de la membrana contribuyendo a la estabilidad de las enzimas celulares [20].

## Preparación de crioprotectores

### Glicerol

Preparar una solución al 20% v/v de glicerol en agua destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Se puede almacenar a temperatura ambiente hasta 3 meses. Agregar a la suspensión microbiana para una concentración final del 10%.

### DMSO

Preparar la solución y esterilizar por filtración. Puede ser almacenada a temperatura ambiente solo por un mes. Agregar a la suspensión microbiana para una concentración final de 5%.

### Leche descremada

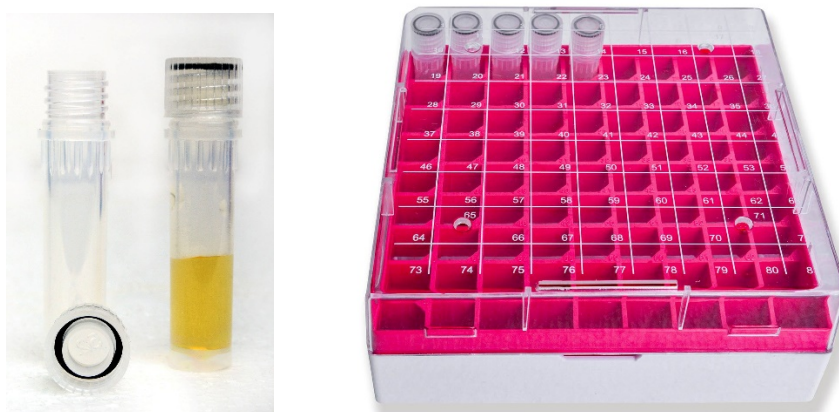
Se utiliza polvo deshidratado para uso microbiológico. Preparar una solución al 20% p/v en agua destilada. Distribuir en tubos en cantidades de 10 ml y esterilizar en autoclave a 116°C durante 20 minutos, para evitar caramelización. Debe almacenarse a 4°C.

## Viales para preservación a ultra bajas temperaturas

Los viales para criopreservación se denominan crioviales, deben ser aptos para tolerar ultra bajas temperaturas y mantenerse cerrados herméticamente. Generalmente se utilizan crioviales de polipropileno con tapa a rosca y anillo O para asegurar el cierre hermético

(Figura 4). Estos viales son comercializados por varias empresas en distinto tamaños (1ml, 2 ml). El tamaño dependerá del modelo de caja que se utilizará.

**Figura 4: Viales y caja de polipropileno para criopreservación**



## Preparación del cultivo para criopreservar

La cepa se siembra en medio de cultivo adecuado para obtener máximo desarrollo, preferentemente sólido en placa de Petri. La incubación se lleva a cabo a temperatura y atmósfera de crecimiento óptimas hasta fase de desarrollo logarítmico tardío o fase estacionaria temprana. Se suspende el cultivo en el criovial que contiene caldo tripticasa de soya más el crioprotector seleccionado o leche descremada al 10%. Si la cepa fue cultivada en medio líquido, una vez en fase estacionaria, se centrifuga el cultivo y se resuspende el pellet en caldo tripticasa de soya más el crioprotector seleccionado o en leche descremada al 10%. El volumen de alícuotas para ultracongelar, es usualmente 0.5-1 ml. El inóculo inicial recomendado no debe ser menor a  $10^7$  UFC/ml.

Cuando se agrega un agente crioprotector penetrante a la suspensión bacteriana, es conveniente dejar la mezcla a temperatura ambiente por 10-15 minutos antes de iniciar el proceso de congelamiento, ya que a esta temperatura, el crioprotector puede penetrar más fácilmente la célula bacteriana. Sin embargo, es importante no dejar a temperatura ambiente por tiempos más prolongados, porque los agentes crioprotectores se tornan tóxicos para la célula.

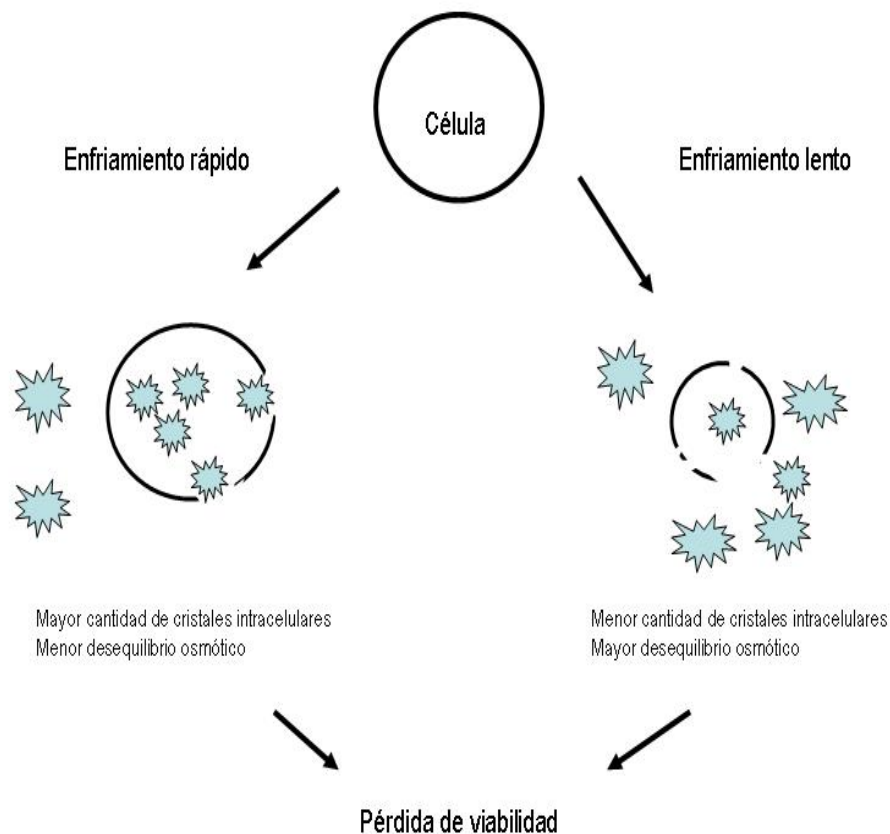
Un punto crítico para asegurar máxima viabilidad de los cultivos ultracongelados, es la velocidad de enfriamiento durante el proceso de criopreservación. En la figura 5 se muestran los efectos fisiológicos de la velocidad de enfriamiento sobre la célula en proceso de criopreservación. ATCC (*American Type Culture Collection*) recomienda un enfriamiento controlado ( $-1$  a  $-5$  °C  $\text{min}^{-1}$ ) del criovial hasta una temperatura de  $-30$ °C, seguido de un enfriamiento más rápido hasta llegar a la temperatura final de almacenamiento. Existen dispositivos comerciales para el congelamiento controlado (*controlled-rate freezer*

systems). Es posible lograr un congelamiento controlado en forma manual mediante sistemas comerciales sencillos diseñados para conseguir una velocidad de refrigeración muy próxima a  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , como el que se muestra en la figura 6. También se puede realizar en forma artesanal, colocando los crioviales en cajas de poliestireno con material aislante dentro del *ultrafreezer* por un par de horas antes de almacenarlos directamente a la temperatura final.

Algunos investigadores han documentado alta recuperación de cultivos microbianos ultracongelados, utilizando altas y bajas velocidades de enfriamiento, mientras que con velocidades intermedias observaron disminución significativa de la viabilidad celular [21]. La respuesta de las células no sólo depende de la velocidad de enfriamiento, sino también del tamaño celular, la permeabilidad al agua y la presencia de pared celular [22].

Un método muy útil y eficaz para preservar microorganismos en ultrafrío es utilizar perlas de vidrio. Los crioviales contienen perlas de vidrio de aproximadamente 3mm y aproximadamente 200  $\mu\text{l}$  de glicerol al 20% v/v. Solo debe añadirse 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión de cultivo fresco, mezclar y congelar. Para reconstituir el cultivo, solo es necesario remover una perla e inocularla en medio de cultivo y de esta forma no es necesario el descongelamiento de todo el vial.

**Figura 5: Efectos de la velocidad de enfriamiento durante el proceso de criopreservación**





**Figura 6: Sistema manual de enfriamiento controlado**



## **5. RECUPERACIÓN DE CULTIVOS PRESERVADOS A TEMPERATURAS ULTRA BAJAS**

El proceso de descongelamiento provoca serios daños celulares. Las temperaturas críticas están en el rango  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Algunos estudios sugieren que un calentamiento rápido durante ese rango de temperatura mejora la tasa de recuperación [14]. Al retirar el criovial del *ultrafreezer* o tanque de nitrógeno líquido, debería colocarse en un baño a  $35^{\circ}\text{C}$  hasta que todo el hielo haya desaparecido. Una vez descongelado, el cultivo debe transferirse inmediatamente a un medio de cultivo adecuado. Durante el proceso de descongelamiento los cambios rápidos de temperatura y los cambios de presión dentro de los viales pueden hacer que estos exploten. Por lo tanto, el personal debe utilizar vestimenta protectora y gafas durante este proceso. Para fines más prácticos en el laboratorio, los viales de la mayoría de bacterias y levaduras pueden ser descongelados a temperatura ambiente y cultivarse con buenos porcentajes de recuperación para la mayoría de los microorganismos utilizados de rutina [14]. Si es necesario, se puede descongelar solo el menisco superior de la suspensión, tomar una alícuota (20-50 ul) para subcultivar y guardar el criovial nuevamente en el *ultrafreezer* sin que ocurran daños importantes. Sin embargo, esta práctica no se recomienda y se sugiere planificar con anterioridad, el número de crioviales producidos para descongelar completamente y descartar cuando se requiera el cultivo de la cepa.

## 6. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es el método preferido para la preservación a largo plazo, por su efectividad, pero también por el bajo costo de mantenimiento y por la facilidad para transportar especímenes biológicos liofilizados en condiciones poco exigentes. Es más eficaz que la ultracongelación, debido a que el riesgo de formación de cristales intracelulares que comprometen la viabilidad es mucho menor. Es un método óptimo para la preservación de muchas bacterias que se mantienen viables y pueden almacenarse por más de 30 años, excepto *Helicobacter pylori* y *Clostridium botulinum* que no toleran el proceso de liofilización y los géneros *Campylobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Azotobacter*, que solo se mantienen viables por 8-15 años [23].

El proceso de liofilización reduce la actividad de agua mediante congelamiento y sublimación del hielo al disminuir la presión atmosférica sometiendo el producto congelado al vacío. Este proceso es cruento y el éxito depende de las condiciones en las que se ha realizado. Existe variado equipamiento, el más completo es costoso y requiere mantenimiento mecánico. La elección del mejor método de liofilización depende del producto y de lo que se va a hacer con él. Los fenómenos de transferencia de calor y masa durante el proceso de liofilización demandan que las siguientes condiciones sean respetadas: gran superficie expuesta y poca profundidad de producto. Existen dos clases de tecnología: liofilizadores de cámara y de erizo [23].

### Liofilizadores de cámara (stopering)

Cuentan con una cámara que dispone de una o más bandejas dentro de las cuales existen sensores y circuitos de enfriamiento y calefactores. Tienen un dispositivo de cierre con bandeja flotante que permite el cierre de frascos o ampollas especiales en condiciones de vacío o atmósfera controlada. Disponen de un sistema de enfriamiento y bomba de vacío instrumentado. El total de las variables en juego puede ser modificada por programación según los requerimientos del proceso.

### Liofilizadores de erizo

Están formados por un sistema de vacío, un condensador y un sistema de conexión de ampollas. Disponen de un recipiente refrigerado con un líquido de bajo punto de congelación en el que se introducen las ampollas. Una vez conectada al sistema, el exterior de la ampolla queda expuesta a la temperatura ambiente y no se tiene control sobre la transferencia de calor.

## Viales

Se utilizan viales de borosilicato. Para liofilización en cámara se utilizan ampollas dobles, una ampolla de vidrio exterior para proteger la ampolla que contiene el producto liofilizado. Se agrega silica gel en el fondo de la ampolla exterior y un tapón de algodón antes de insertar la ampolla con el producto liofilizado. También se pueden utilizar frascos. Para liofilización en erizo se utiliza ampolla de vidrio, no pueden ser utilizados frascos. Los frascos y/o ampollas deben ser esterilizadas en horno seco antes de ser utilizados.

## Cerrado y almacenamiento del producto liofilizado

Cuando el producto ha sido sometido a un correcto proceso de liofilización y consecuentemente se ha reducido la actividad de agua, es en general muy higroscópico y sensible a la oxidación. El producto liofilizado queda expuesto a las condiciones que le aporte la atmósfera del recipiente (ampolla o frasco) que lo contiene y a la temperatura e iluminación que reciba el mismo. Las condiciones varían según el tipo de recipiente en el que se realice el proceso. Si el producto es liofilizado en frasco, el cierre se realiza por el sistema *aluca*p y este es un punto sensible en el proceso, el cierre puede ser hecho al vacío o en atmósfera controlada. Cuando el producto se liofiliza en ampolla en liofilizador en erizo, el cierre se realiza por la fusión del vidrio del cuello de la ampolla. Se pueden cerrar las ampollas al vacío o con una atmósfera controlada de nitrógeno seco u otro gas inerte. De ser bien realizado, brinda un sellado perfecto y el producto está preservado en forma óptima del daño del oxígeno y la humedad.

El almacenamiento de los cultivos liofilizados a temperatura ambiente no asegura el mantenimiento de la viabilidad por períodos prolongados. Es conveniente almacenar los viales en oscuridad y a temperatura de refrigeración. La viabilidad es aceptable almacenando a 4°C, sin embargo las temperaturas óptimas de almacenamiento para asegurar máxima supervivencia es en el rango -30°C a -60°C [14].

## Medios soporte y preparación del cultivo

El medio soporte para liofilizar se compone de un agente criopreservante, también denominado lioprotector, que estabiliza las células cuando el agua es removida, y una matriz que permite que la muestra mantenga su forma luego del proceso de liofilización. Los disacáridos como sacarosa y trehalosa son excelentes lioprotectores, las matrices más utilizadas son manitol, seroalbúmina bovina, suero y leche descremada. La leche descremada se utiliza más frecuentemente para liofilización en cámara mientras que para liofilización en erizo se prefiere un medio soporte más sacarosa como lioprotector.

La concentración de leche descremada utilizada es la misma que para la criopreservación. La sacarosa se prepara en solución en agua al 24% p/v y se mezcla en proporción 1:1 con la suspensión del microorganismo para obtener una concentración final del 12%.

El medio para liofilización recomendado y utilizado por ATCC tiene la siguiente composición para 100 ml: Caldo tripticasa de soya 0.75 gramos, Sacarosa 10 gramos, Seroalbumina bovina fracción V (SAB) 5 gramos. La SAB no tolera la esterilización por autoclave, por lo tanto la solución se prepara en forma individual y se esteriliza por filtración con membranas de 0.22 um de tamaño de poro. El medio base se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos, se deja enfriar y se añade en forma aséptica la solución estéril de SAB.

Es importante utilizar cultivos en fase estacionaria temprana y preparar la suspensión que será sometida al proceso de liofilización con un inóculo de  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/ ml. El volumen por vial depende del tipo de frasco y/o ampolla, pero generalmente es 0.3 a 0.5 ml.

## Reconstitución de cultivos liofilizados

Los viales deben abrirse con cuidado, utilizando elementos de protección personal y siguiendo las normas de bioseguridad, ya que los mismos están cerrados al vacío y al abrirse pueden generar dispersiones. La reconstitución del cultivo se realiza añadiendo un pequeño volumen (0.1 a 0.5 ml) de medio de cultivo, mezclando cuidadosamente hasta la disolución del polvo liofilizado para inmediatamente cultivar en medios de cultivos, atmósfera y temperatura adecuados según el microorganismo.

La *Tabla 2* intenta resumir la información desarrollada a lo largo del capítulo. Es importante enfatizar que tanto la criopreservación como la liofilización tienen ventajas y desventajas, y el comportamiento de las cepas preservadas varían entre las distintas especies. Aún cepas de la misma especie pueden responder en forma diferente al mismo proceso de preservación. El mantenimiento de la viabilidad a lo largo del tiempo de los microorganismos preservados depende de ciertos factores críticos como la composición del medio soporte de suspensión y de rehidratación (en el caso de liofilización), el tipo de crioprotector utilizado, la velocidad de congelamiento y descongelamiento, el estadio de desarrollo del cultivo a preservar, el tamaño celular, la composición de sus membranas, el contenido de agua y el tamaño del inóculo inicial.

**Tabla 2: Métodos de preservación para bacterias**

Método de preservación	Viabilidad durante almacenamiento	Observaciones
Subcultivos periódicos	1-2 meses	Microorganismos fastidiosos como <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria</i> spp., and <i>Haemophilus</i> spp, solo -70°C, N <sub>2</sub> L o liofilización.  Las cepas de referencia para controles de calidad, pueden mantenerse a -20°C hasta 1 año o -70°C indefinidamente
Capa de aceite	1-2 años	
-20°C	1-3 años	
-70°C	1-10 años	
N <sub>2</sub>	Hasta 30 años	
Liofilización	Hasta 30 años	Excepto <i>Helicobacter</i> spp, <i>C. botulinum</i> , <i>Campylobacter</i> spp

## BIBLIOGRAFÍA

1. Prudden T. On bacteria in ice, and their relations to disease, with special reference to the ice-supply of New York City. *Med Rec.* 1887; 31:341–78.
2. Swift HF. Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *J Exp Med.* 1921; 33:69–75.
3. Pieper DH, Reineke W. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 2000; 11: 262-70.
4. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett.* 2013; 339: 1–9.
5. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 94: 565.
6. ENAC 04:2002. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos.
7. ISO/IEC17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
8. OECD (2001). Biological Resource Centres: Underpinning the future of life sciences and biotechnology. OECD Publications, Paris, France. pp 66.
9. OECD (2007). Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres (June 2007). [On-line]:  
[http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en\\_2649\\_34537\\_38777060\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html).
10. Hay RJ. The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry.* 1988; 171: 225-37.
11. Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(41):E2774-83.
12. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology.* 2003; 37: 45–50.
13. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods.* En: Bills G, Muller GM, Foster MS editors. Elsevier, Amsterdam, 2004, p 37-47.
14. She R, Petti C. Procedures for the Storage of Microorganisms. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D editors. *Manual of*

- Clinical Microbiology, Eleventh Edition*, Washington DC, ASM Press, 2015, p 161-168.
15. Morales YE, Duque E, Rodríguez O. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Rev. Biotecnología Aplicada*. 2010; 14 (2):11.
  16. Kulkarni GA, Chitte RR. A Preservation of Thermophilic Bacterial Spores Using Filter Paper Disc Techniques. *J Bioprocess Biotech*. 2015; 5:223.
  17. van Griethuysen A, van Loo I, van Belkum A, Vandenbroucke-Grauls C, Wannet W, van Keulen P, Kluymans J. Loss of the *mecA* Gene 131 during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1361-65.
  18. Riederer K, Iyer S, Shemes S, Dejaeghere V, Sharma M, Szpunar S, Khatib R. Effects of frozen storage on detection of intermediate vancomycin susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates. *J Clin Microbiol*. 2015; 53:2392.
  19. Smith D, Ryan M. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *The Scientific World Journal*. 2012. On line: <https://doi.org/10.1100/2012/805659>
  20. Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, Hagman KE, Nickerson CA. Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80°C Bacterial Stocks. *J Microbiol Met*. 2008; 75: 135-38.
  21. Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl Environ Microbiol*. 2004; **70**: 268–72.
  22. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P. Rates of chilling to 0 degrees °C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 77: 1379–87.
  23. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2008; 54:9–24.
  24. Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon S, Bégaud E, Bizet C, Pascual J., Ruvira MA, Macián MC, Arahal DR. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 3559-71.