



Conformación de colecciones de cultivos microbianos

Editor: Jean Franco Castro F.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Boletín INIA / N° 428



ISSN 0717-4829



**GOBIERNO
REGIONAL
DEL MAULE**





Conformación de colecciones de cultivos microbianos

Editor: Jean Franco Castro F.
Centro Regional
de Investigación INIA Quilamapu



CONFORMACIÓN DE COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS

Editor

Jean Franco Castro F.
Bioingeniero, Dr. Ingeniería Química y Biotecnología

Edición de textos

Hugo Rodríguez A.

Diseño gráfico y diagramación

Ricardo González Toro.

Director Regional INIA

Rodrigo Avilés R.

Boletín INIA N° 428.

Cita bibliográfica correcta

Castro F., Jean Franco (Ed.) 2020. "Conformación de colecciones de cultivos microbianos". Boletín INIA N° 428, 186 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillán, Chile.

ISSN 0717-4829

Este boletín fue editado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias,
Centro Regional de Investigación INIA Quilamapu, Ministerio de Agricultura.

Permitida su reproducción total o parcial citando la fuente y el editor.

Las marcas y nombres comerciales de productos y empresas mencionadas en este libro, sólo se incluyen por su pertinencia técnica en temas específicos y no representan recomendación del INIA.

Chillán, Chile, octubre de 2020.

Índice

Prólogo	9
1. Introducción a las colecciones de cultivos microbianos	15
1.1. Los microorganismos y la importancia de preservarlos	15
1.2. ¿Qué es una colección de cultivos microbianos y cuál es su función?	16
1.3. Colecciones de cultivos en el contexto internacional	18
1.4. El Tratado de Budapest y el reconocimiento internacional del depósito microbiano	20
1.5. Objetivo del presente boletín	22
1.6. Literatura consultada	23
2. Conformación de una colección de cultivos microbianos	27
2.1. Requisitos mínimos para la conformación de una colección de cultivos microbianos	27
2.2. Organización del personal	28
2.3. Las instalaciones de una colección de cultivos microbianos	30
2.3.1. Unidad de aislamiento	32
2.3.2. Unidad de preservación	34
2.3.3. Unidad de microscopía e identificación morfológica	36
2.3.4. Unidad de identificación molecular	37
2.3.5. Unidad de formulación de medios de cultivo	38
2.3.6. Unidad de administración y documentación	40
2.4. Actividades llevadas a cabo en una colección de cultivos microbianos	40
2.4.1. Aislamiento de microorganismos	41
2.4.2. Almacenamiento de microorganismos	41
2.4.3. Evaluación de viabilidad de microorganismos	43
2.4.4. Identificación de microorganismos	43
2.4.5. Distribución de microorganismos a terceros	44
2.4.6. Documentación y gestión de calidad	45
2.4.7. Otros servicios	45
2.5. Aspectos de bioseguridad y orden en el laboratorio	45
2.6. Literatura consultada	47

3. Gestión de calidad en las colecciones de cultivos microbianos 51

3.1.	Importancia de implementar un sistema de gestión de calidad (SGC) en una colección de cultivos microbianos	51
3.2.	¿Qué es un SGC?	53
3.3.	Etapas para el diseño de un SGC	55
3.3.1.	Creación del equipo de trabajo responsable de diseño e implementación	55
3.3.2.	Identificación de las necesidades de las partes interesadas internas y externas (clientes)	55
3.3.3.	Identificación de los procesos y procedimientos del SGC	55
3.3.4.	Definición de la política y objetivos de calidad	57
3.3.5.	Definición de la estructura documental	58
3.3.6.	Capacitación	59
3.4.	Implementación del SGC	59
3.5.	Verificación y seguimiento del SGC	59
3.6.	Consideraciones finales	60
3.7.	Literatura consultada	61

4. Colecta de microorganismos 65

4.1.	Importancia de las colectas de microorganismos para la conformación de colecciones de cultivos microbianos	65
4.2.	Objetivo de la colecta	66
4.3.	Planificación de la colecta	67
4.4.	Prospección	68
4.5.	Material recomendado para llevar a la colecta	69
4.6.	Ejecución de la colecta	69
4.7.	Entrega de material para procesamiento	72
4.8.	Almacenamiento	72
4.9.	Registro de datos	72
4.10.	Literatura consultada	73

5. Aislamiento de microorganismos fitopatógenos 77

5.1.	La importancia de mantener colecciones de microorganismos fitopatógenos	77
5.2.	Aislamiento de microorganismos fitopatógenos	78
5.2.1.	Colecta y transporte de las muestras	78
5.2.2.	Procesamiento de las muestras en el laboratorio	81
5.2.3.	Métodos de aislamiento de microorganismos	83
5.2.3.1.	Cultivo directo	84
5.2.3.2.	Cámara húmeda	85

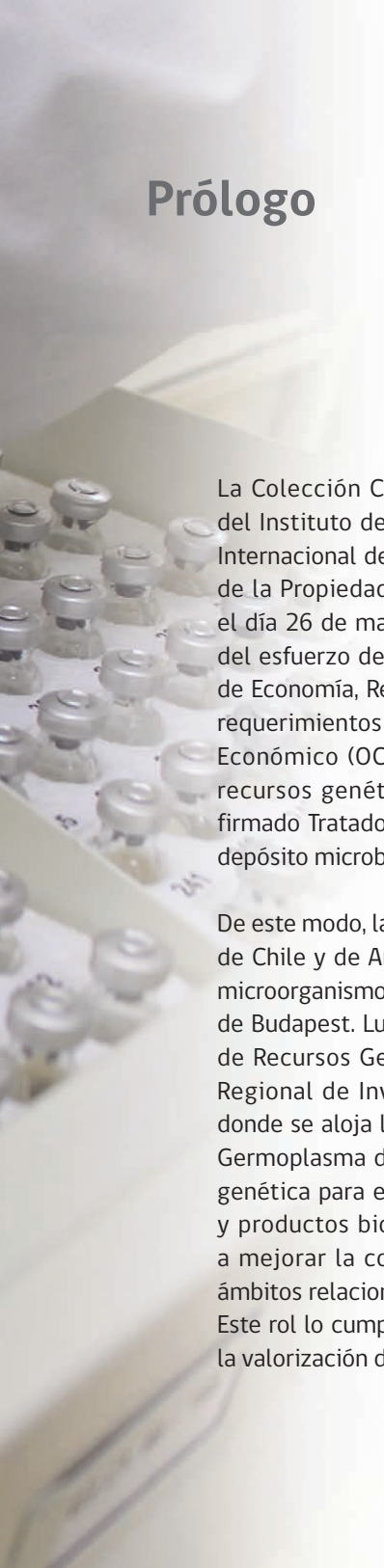
5.2.3.3.	Siembra de tejido vegetal en medio de cultivo	86
5.2.3.4.	Cultivo de raíces en agua	87
5.2.4.	Obtención de cultivos puros de los patógenos	88
5.3.	Identificación de los microorganismos patógenos	89
5.4.	Literatura consultada	91
6.	Preservación de microorganismos por liofilización	95
6.1.	Antecedentes históricos de la liofilización y la importancia de su uso	95
6.2.	La técnica de liofilización y su aplicación para preservar microorganismos	96
6.3.	Equipamiento necesario para la liofilización	98
6.3.1.	Liofilizador	98
6.3.2.	Insumos, accesorios y otros equipos requeridos	99
6.3.3.	Lugar para almacenar el material liofilizado	100
6.4.	Sustancias lioprotectoras	101
6.5.	Etapas fundamentales del proceso de liofilización	101
6.5.1.	Formulación de la muestra	102
6.5.2.	Congelación de la muestra	103
6.5.3.	Secado de la muestra	103
6.5.4.	Sellado de la muestra	103
6.6.	Procedimientos para la preservación de microorganismos por liofilización	103
6.6.1.	Etapas 1. Inspección primaria del cultivo microbiano	104
6.6.2.	Etapas 2. Procesamiento primario de la muestra	104
6.6.3.	Etapas 3. Formulación de la muestra para la liofilización	105
6.6.3.1.	Etapas 3.1. Formulación líquida para bacterias y hongos	106
6.6.3.2.	Etapas 3.2. Formulación en soporte sólido para basidiomicetes en semillas de mijo (<i>Pennisetum typhoides</i>)	107
6.6.4.	Etapas 4. Precongelado y liofilización de las muestras	110
6.6.5.	Etapas 5. Evaluación de viabilidad de la muestra post-liofilización	112
6.7.	Almacenamiento del material liofilizado	112
6.8.	Regeneración de una muestra liofilizada para distribución	113
6.9.	Registros asociados al procedimiento de liofilización	113
6.10.	Literatura consultada	115
7.	Preservación de microorganismos por congelación	119
7.1.	Importancia de la preservación de microorganismos por congelación	119
7.2.	La criopreservación como herramienta usada en una colección de cultivos microbianos	120
7.3.	Equipamiento necesario para la criopreservación	121

7.3.1.	Congeladores y tanques de almacenamiento	121
7.3.2.	Insumos, dispositivos y accesorios requeridos para la criopreservación	124
7.4.	Sistemas de criopreservación	125
7.4.1.	Crioprotectores	125
7.4.2.	Crioperlas	126
7.5.	Procedimiento para la preservación de microorganismos por congelación	126
7.5.1.	Etapas 1. Inspección primaria del cultivo microbiano	127
7.5.2.	Etapas 2. Procesamiento primario de la muestra	128
7.5.3.	Etapas 3. Realización de copias de seguridad del cultivo microbiano	129
7.5.4.	Etapas 4. Descenso programado de temperatura	131
7.5.5.	Etapas 5. Almacenamiento en congelador	131
7.5.6.	Etapas 6. Evaluación de viabilidad de la muestra post-criopreservación	132
7.6.	Almacenamiento del material criopreservado	132
7.7.	Regeneración de una muestra criopreservada para distribución	133
7.8.	Registros asociados al procedimiento de criopreservación	133
7.9.	Literatura consultada	134
8. Evaluación de viabilidad de microorganismos		139
8.1.	Concepto de viabilidad microbiana	139
8.2.	Procedimientos para evaluar la viabilidad microbiana en colecciones de cultivo	139
8.2.1.	Evaluación de viabilidad de bacterias	140
8.2.2.	Evaluación de viabilidad de hongos	142
8.3.	Factores que afectan la viabilidad microbiana en el proceso de preservación	142
8.3.1.	Factores que afectan la viabilidad celular en la liofilización	143
8.3.2.	Factores que afectan la viabilidad celular en la criopreservación	144
8.4.	Evaluación de viabilidad microbiana en una colección de cultivos	148
8.4.1.	Equipamiento e insumos para evaluar viabilidad celular	149
8.4.2.	Evaluación de la viabilidad en muestras liofilizadas	149
8.4.3.	Evaluación de la viabilidad en muestras criopreservadas	150
8.5.	Registros asociados al procedimiento de evaluación de viabilidad	152
8.6.	Literatura consultada	153
9. Identificación de microorganismos		157
9.1.	Importancia de la identificación de microorganismos	157
9.2.	Identificación fenotípica de microorganismos	158
9.2.1.	Metodología para análisis fenotípico en hongos	158
9.2.2.	Metodología para análisis fenotípico en bacterias	159

9.3.	Identificación genotípica de microorganismos	162
9.3.1.	Etapa 1. Recepción de cultivo microbiano puro	163
9.3.2.	Etapa 2. Extracción de ácido nucleicos desde microorganismos	164
9.3.3.	Etapa 3. Tipificación molecular de microorganismos	165
9.3.4.	Etapa 4. Amplificación de secuencias nucleotídicas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	165
9.3.5.	Etapa 5. Electroforesis de los productos de PCR	167
9.3.6.	Etapa 6. Metodología para la secuenciación de genes	168
9.3.7.	Etapa 7. Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas secuenciadas	169
9.4.	Metodología para análisis de filogenia	172
9.4.1.	Etapa 1. Selección de bases de datos de secuencias nucleotídicas para la identificación de un microorganismo	172
9.4.2.	Etapa 2. Selección de herramientas bioinformáticas para el análisis filogenético	174
9.4.3.	Etapa 3. Selección de metodología para la realización de un análisis filogenético	175
9.5.	Depósito de una secuencia de ADN en una base de datos	176
9.5.1.	Metodología para ingresar una secuencia a una base de datos	177
9.6.	Literatura consultada	178

Glosario	183
-----------------	-----





Prólogo

La Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) es una Autoridad Internacional de Depósito (IDA), reconocida por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), la cual se constituye oficialmente el día 26 de marzo de 2012. La creación de la CChRGM es el resultado del esfuerzo del Gobierno de Chile, específicamente de los ministerios de Economía, Relaciones Exteriores y Agricultura, el cual responde a los requerimientos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la conservación, distribución y acceso a los recursos genéticos, además de dar cumplimiento al recientemente firmado Tratado de Budapest, sobre el reconocimiento internacional del depósito microbiano en una Autoridad Internacional de Depósito.

De este modo, la CChRGM se convirtió en la primera colección microbiana de Chile y de América Latina en tener la categoría IDA para almacenar microorganismos para fines de pateamiento bajo los términos del Tratado de Budapest. Luego, en el mes de abril de 2013, INIA inaugura el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM), emplazado en el Centro Regional de Investigación Quilamapu, de la ciudad de Chillán, lugar donde se aloja la CChRGM. El BRGM forma parte de la Red de Bancos de Germoplasma del INIA, cuyo objetivo es ser el reservorio de diversidad genética para el desarrollo de nuevas variedades vegetales cultivables y productos biotecnológicos a base de microorganismos, tendientes a mejorar la competitividad de los productores nacionales y liderar ámbitos relacionados a una agricultura amigable con el medio ambiente. Este rol lo cumple a través de la preservación, la utilización sostenible y la valorización de los recursos genéticos del país mediante investigación.



En la actualidad, la Red de Bancos resguarda más de 60 mil accesiones de especies vegetales nativas y cultivadas de importancia económica en los Bancos de Germoplasma Vegetal, y más de 4 mil accesiones de microorganismos, correspondiente a colecciones públicas, privadas, de patentamiento y de trabajo, en la CChRGM. Los bancos de la Red tienen presencia nacional y se distribuyen en las regiones de Coquimbo, Metropolitana, Ñuble, La Araucanía y Los Lagos, y su contribución técnica es desarrollar metodologías de preservación de germoplasma microbiano y vegetal a largo plazo.

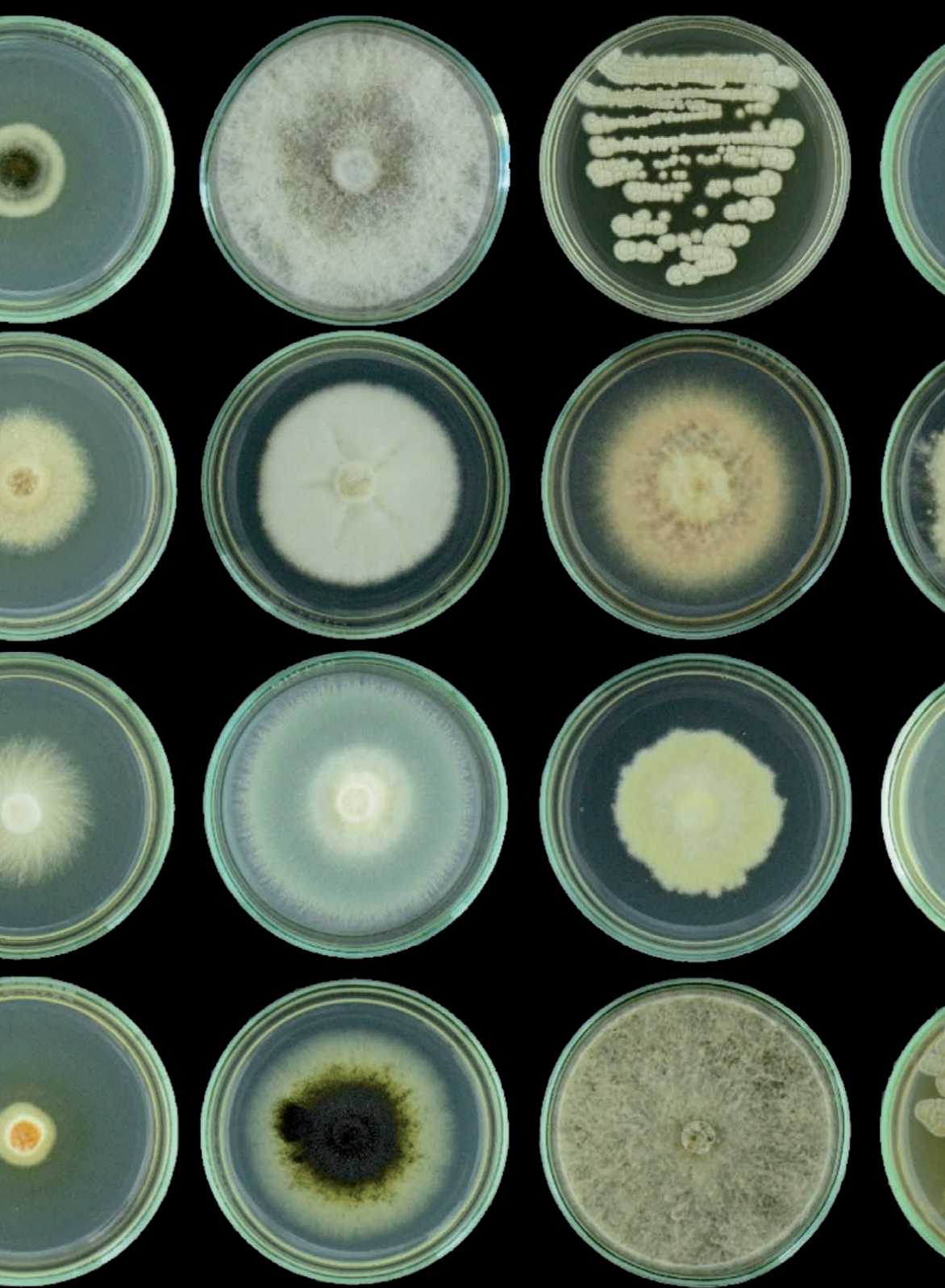
El presente boletín es una recopilación de la experiencia adquirida por la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) del INIA en el ámbito de la preservación de la diversidad genética microbiana de Chile. En los próximos nueve capítulos, se abordarán diferentes tópicos cuyo objetivo es guiar y apoyar al lector en aspectos teóricos y prácticos para la conformación de una colección microbiana en un laboratorio de investigación.

Nuestro objetivo como institución es, compartir con la comunidad científica los conocimientos adquiridos durante años de trabajo en la conformación y manejo de colecciones microbianas y, promover la importancia de la preservación de microorganismos como un reservorio de la biodiversidad genética microbiana de Chile. Este boletín ha sido desarrollado por profesionales y técnicos de la CChRGM y del Banco de Recursos Genéticos Microbianos del INIA y pretende consolidar a este equipo de trabajo como un referente en el ámbito de conformación y manejo de colecciones de cultivos microbianos a nivel nacional.

Jean Franco Castro F.

Curador

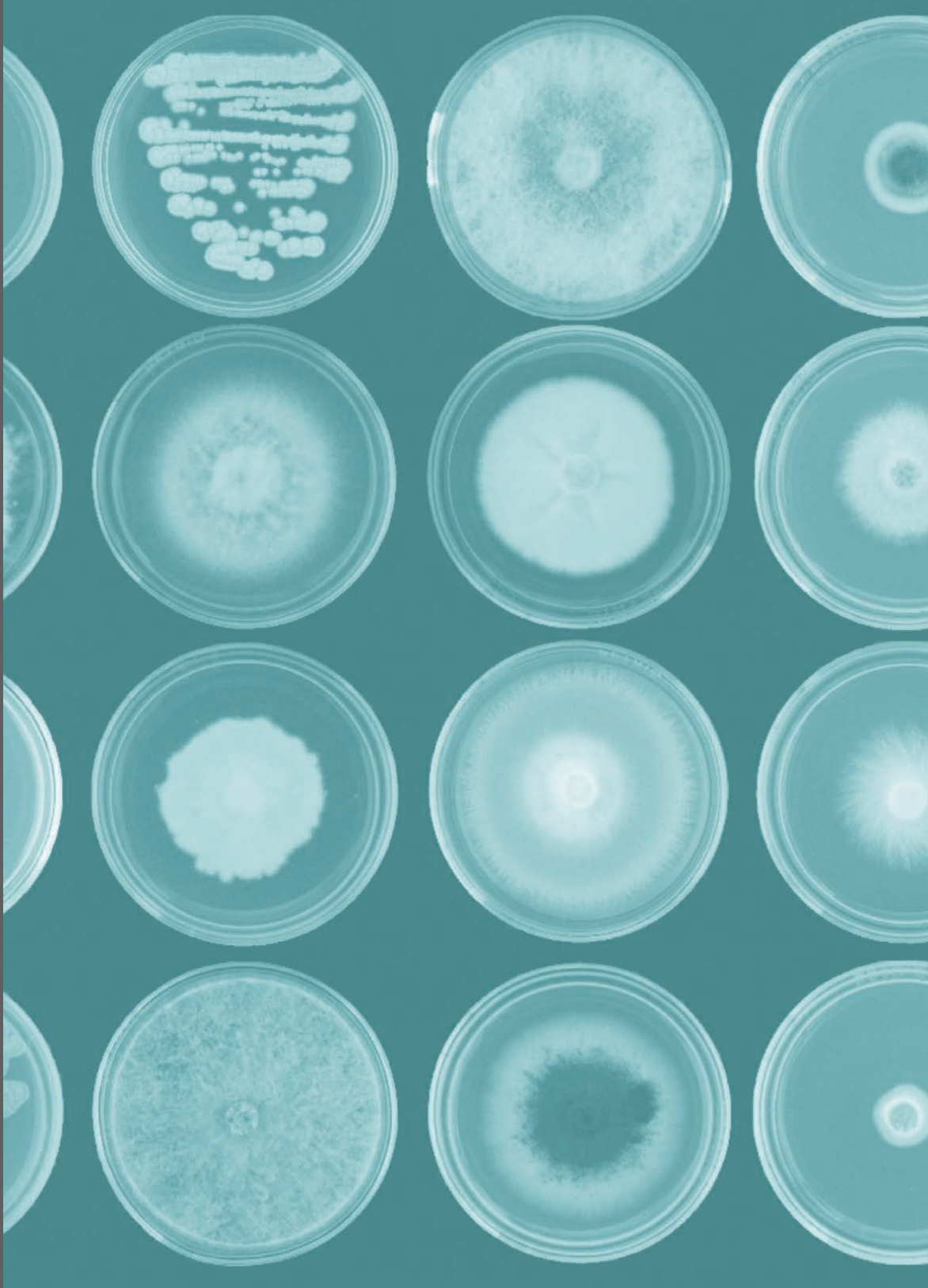
Banco de Recursos Genéticos Microbianos





1

Introducción a las colecciones de cultivos microbianos



Capítulo 1

Introducción a las colecciones de cultivos microbianos

Jean Franco Castro F.

Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

1.1. Los microorganismos y la importancia de preservarlos

La microbiología es una disciplina de la ciencia que se encarga de estudiar aquellos organismos de pequeño tamaño que no pueden ser visualizados a simple vista, si no que a través de un microscopio. Estos organismos son conocidos como microorganismos.

Los microorganismos pueden ser clasificados en procariontes y eucariontes. Los primeros no poseen organelos delimitados por membrana y su material genético se encuentra libre en el citoplasma, mientras que los segundos sí poseen organelos delimitados por una membrana y su material genético se encuentra confinado en una estructura llamada núcleo. En el grupo de los procariontes se encuentran las bacterias y arqueas, todos organismos unicelulares, a diferencia del grupo de los eucariontes, compuesto por hongos, protistas, plantas y animales, los cuales son organismos pluricelulares, a excepción de los protistas que en su mayoría son unicelulares. Los microorganismos están presentes en todas partes y juegan un rol fundamental en innumerables procesos naturales tales como, descomposición de materia orgánica, reciclaje de elementos químicos, fijación de nitrógeno en el suelo, entre otras. También pueden establecer relaciones simbióticas o ser causantes de enfermedades en plantas, animales o insectos, pueden solubilizar minerales o ser productores de enzimas capaces de degradar compuestos tóxicos de desechos domésticos e industriales.

Debido a su versatilidad en la realización de múltiples funciones, los microorganismos tienen una amplia aplicación en procesos industriales para la obtención de productos biotecnológicos de utilidad para la humanidad (Cuadro 1.1.). Desde el punto de vista económico y según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la biodiversidad y la preservación de los recursos genéticos entregan la materia prima para el desarrollo de productos biotecnológicos en países desarrollados y emergentes. Dada la gran cantidad de ejemplos que señalan que los microorganismos pueden proveer soluciones a los problemas mundiales en salud pública, ambiente, entre otras, es crucial que esta diversidad microbiana no se pierda y que sea identificada, caracterizada y explotada de una manera sostenible en el tiempo para el beneficio de toda la sociedad.

En este contexto, para preservar la biodiversidad microbiológica es necesario disponer de un lugar seguro y adecuado para mantener las propiedades genotípicas y fenotípicas originales de los microorganismos, asegurando la reproducibilidad en los procesos industriales o de investigación en que se utilizan. Estos lugares existen y son denominados *colecciones de cultivos microbianos*, los cuales tienen como misión la preservación de los microorganismos por largos períodos de tiempo en forma pura y viable.

Cuadro 1.1. Principales usos de los microorganismos en procesos industriales.

Industria	Aplicación
Alimentaria	Producción de yogurt, queso, pan, vinagre.
Minera	Lixiviación de minerales de baja ley.
Agrícola	Control biológico de plagas y enfermedades, promoción de crecimiento de plantas.
Bebidas alcohólicas	Producción de vinos y cervezas.
Farmacéutica	Producción de antibióticos y vacunas.
Medioambiental	Remediación de suelos o efluentes contaminados, degradación de compuestos clorados, degradación de plásticos.

1.2. ¿Qué es una colección de cultivos microbianos y cuál es su función?

Una colección de cultivos microbianos es una entidad que preserva la diversidad de los recursos genéticos microbianos de forma *ex situ*. En otras palabras, se encarga de mantener componentes de la biodiversidad fuera de

sus hábitats naturales de forma ordenada, pura y viable. Su misión se puede resumir en tres grandes objetivos: (i) preservar microorganismos por largos períodos de tiempo, (ii) recibir depósitos o donaciones de microorganismos, donde cada colección de cultivos microbianos establece el número de cepas o grupos microbianos específicos para recibir; (iii) distribuir o suministrar cepas correctamente identificadas a la comunidad científica o industrial (Figura 1.1.).

En términos generales, las actividades realizadas en una colección de cultivos se enmarcan en la preservación y en la autenticación del material preservado, es decir, en la correcta identificación de un microorganismo a nivel de género y especie de acuerdo a las taxas válidamente publicadas, utilizando claves taxonómicas basadas en morfología, marcadores moleculares y propiedades bioquímicas del microorganismo.

Toda colección de cultivos tiene que ser correctamente administrada, lo cual implica llevar un registro al día de todos los microorganismos preservados y su respectiva identificación dentro de un sistema de gestión de calidad, con procedimientos de trabajo establecidos y estrictas medidas de bioseguridad para garantizar la seguridad de sus trabajadores y del entorno. Estas actividades son arduas y demandantes de tiempo, las cuales requieren de un equipo multidisciplinario de profesionales especializados y constantemente capacitados en ámbitos de manipulación de microorganismos y en gestión de calidad.

Otra de las labores de una colección de cultivos es vincularse con el medio científico e industrial para apoyar sus actividades de investigación y desarrollo, a través de asesorías, prestación de servicios y distribución de microorganismos a terceros cuando sea requerido. De este modo, una colección de cultivo debe utilizar sistemas de preservación para mantener los microorganismos puros y viables en el tiempo, que aseguren la estabilidad genética y sus características fenotípicas originales para ponerlos al servicio de la comunidad. Para garantizar la vinculación con el medio, se recomienda la confección de un catálogo de cepas y una paleta de servicios, disponibles en internet para que cualquier solicitante pueda obtener la información de la cepa o servicios que desee solicitar.

Dependiendo del tipo de la colección de cultivos, existen diferentes categorías en las cuales un cultivo microbiano puede ser depositado:

a) Depósito público. El microorganismo y la información asociada a este queda disponible para la comunidad y, por tanto, puede ser solicitado por cualquier

persona asociada a alguna institución que demuestre disponer de instalaciones para el trabajo con microorganismos; el objetivo principal es la protección de la biodiversidad.

b) Depósito privado. Toda información asociada al depósito y al microorganismo queda bajo confidencialidad y, en este caso, la cepa sólo puede ser solicitada por el depositante; el objetivo es la valoración comercial.

c) Depósito privado para fines de patentamiento. Sólo puede ser realizado en colecciones de cultivo con la categoría de Autoridad Internacional de Depósito (IDA), otorgado por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) e implica que el microorganismo permanece preservado por al menos 30 años bajo los términos que estipula el Tratado de Budapest, para el resguardo de la propiedad industrial de una invención que involucre el uso de microorganismos.

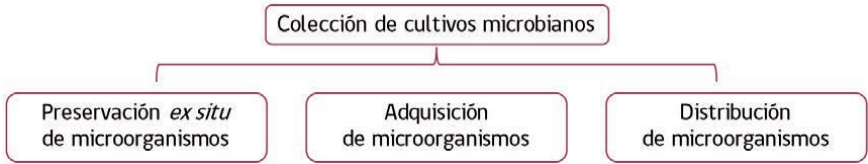


Figura 1.1. Principales funciones de una colección de cultivos microbianos.

1.3. Colecciones de cultivos en el contexto internacional

Sin lugar a dudas, las colecciones de cultivo juegan un rol importante en la preservación *ex situ* de microorganismos, entregando una fuente de recursos microbiológicos para apoyar las investigaciones en biotecnología, y ofreciendo servicios a la comunidad, ya sea para depósitos de microorganismos en catálogos públicos, privados o para fines de patentamiento. Según cifras de la *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM), y el *Culture Collections Information Worldwide* (CCINFO), existen 798 colecciones de cultivos registradas en esta base de datos, provenientes de 78 países, las cuales en conjunto preservan más de 3 millones de microorganismos, comprendiendo un gran número de especies y subespecies entre las que destacan las de hongos y bacterias. Estas cifras respaldan la labor y la importancia que tienen las colecciones de cultivo en el ámbito de la preservación de la diversidad microbiana a nivel mundial (Figura 1.2.).

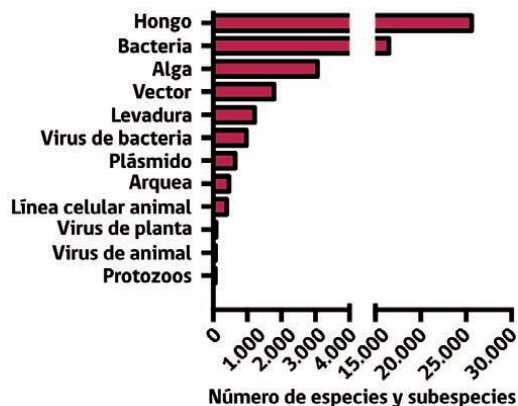


Figura 1.2. Número de especies y subespecies depositadas en colecciones de cultivo a nivel mundial, según datos de 2019 de la *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM).

Las primeras colecciones de cultivos del mundo comienzan a aparecer en Europa hacia fines del siglo XIX, siendo la establecida por el profesor Frantisek Král en el año 1890 en la Universidad Alemana de Praga (República Checa) la primera colección de cultivos microbianos del mundo (Figura 1.3.). Posteriormente, otras colecciones de cultivo de importancia en la actualidad fueron establecidas en Estados Unidos, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (1925, *American Type Culture Collection*, ATCC) y la colección de cultivo del Servicio de Investigación en Agricultura (*Agricultural Research Service*, ARS) que se establece en el año 1940 por el departamento de agricultura de ese país. En el Reino Unido, el Centro de Biociencia y Agricultura Internacional (*Centre for Agriculture and Bioscience International*, CABI) establece una colección de cultivo en el año 1947, bajo el nombre de Colección de Recursos Genéticos CABI (*CABI Genetic Resource Collection*), la cual ha tenido una destacada participación en taxonomía de hongos y en la agricultura a nivel mundial. Otras colecciones de importancia aparecen en España (1960, Colección Española de Cultivos Tipo, CECT) y en Alemania (1969, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, DSMZ) las cuales están activas y vigentes hasta nuestros días, siendo referentes en temas de preservación y distribución de cepas microbianas a nivel mundial.

En el año 2012, el gobierno de Chile adhiere al Tratado de Budapest y, a través de los ministerios de Economía, Agricultura y Relaciones Exteriores, inaugura la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) bajo el alero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), siendo la primera Autoridad

Internacional de Depósito (IDA) a nivel latinoamericano, y en la actualidad es un referente en Chile y en el extranjero sobre el depósito de microorganismos.

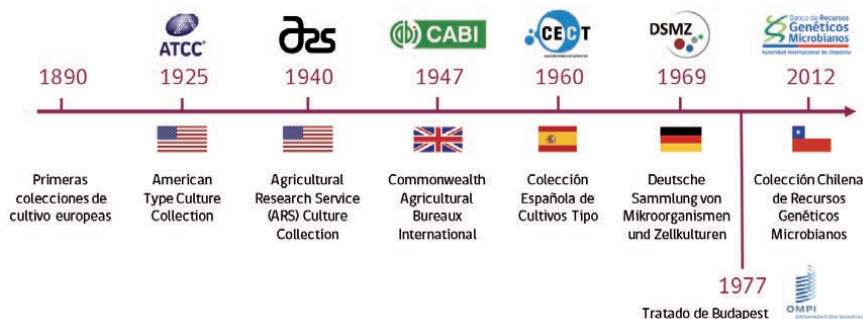


Figura 1.3. Línea de tiempo sobre el establecimiento de algunas colecciones de cultivos y el Tratado de Budapest.

1.4. El Tratado de Budapest y el reconocimiento internacional del depósito microbiano

Las colecciones de cultivos que ofrecen servicios de preservación bajo la categoría de depósito privado para fines de patentamiento se encuentran bajo el marco regulatorio del Tratado de Budapest (1977). Este tratado fue impulsado por la OMPI para crear un sistema internacional uniforme de depósito de microorganismos para fines de patentamiento. Así, ciertas colecciones de cultivo en el mundo fueron reconocidas como “Autoridad Internacional de Depósito” o IDA, dado que el país contratante del Tratado nominara formalmente a una colección de cultivo que asegure la preservación del material microbiano de forma íntegra, pura y viable en el tiempo, dando cumplimiento a estándares y requerimientos del Tratado.

La importancia de este tratado es que todos los países contratantes reconocen el depósito de un microorganismo en una colección IDA, sin importar el país en que se encuentre dicha autoridad, lo que significa que se suprime el requisito de depositar el microorganismo ante cada una de las autoridades nacionales en las que se desea obtener protección de la invención mediante patente, siendo una vía costo-efectiva para todas las invenciones que buscan protección. De esta forma, se establece el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los procedimientos de patentes mediante la realización de un depósito único, sin necesidad de depositar múltiples muestras, país por país, donde se requiera la protección de la invención.

Este depósito único debe realizarse en colecciones de cultivos IDA reconocidas por la OMPI, ya que cumplen con estándares internacionales de preservación, protección del material biológico y donde la muestra almacenada queda disponible para ser distribuida por autorización del depositante. De las colecciones de cultivo registradas a nivel mundial, sólo 48 poseen la categoría de IDA (actualizado a septiembre, 2020). Entre todas las colecciones de cultivos se han preservado un total de 107.890 accesiones microbianas entre los años 2001 y 2018 (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Cepas microbianas depositadas en una colección microbiana con la categoría de Autoridad Internacional de Depósito en el mundo (2001-2018). (Fuente: información publicada por la OMPI).

País	Número de cepas depositadas en una Autoridad Internacional de Depósito (IDA)
Estados Unidos	37.192
China	25.654
Japón	11.150
Alemania	8.379
Corea del Sur	7.174
Reino Unido	5.510
Francia	4.716
Países Bajos	1.314
España	1.120
India	1.067
Bulgaria	1.012
Bélgica	925
Australia	615
Canadá	504
Rusia	378
Hungría	352
Polonia	309
República Checa	131
Italia	130
Chile	92
Letonia	71
México	49
Finlandia	41
Eslovaquia	5
Suiza	0

1.5. Objetivo del presente boletín

El objetivo de este boletín es servir de guía al investigador, encargado de laboratorio, gerente de I+D o estudiante sobre los requerimientos mínimos necesarios para implementar y mantener una colección microbiana en un laboratorio de forma ordenada y con trazabilidad de los procedimientos. En los siguientes capítulos, se abordarán temas prácticos sobre la conformación de una colección de cultivos, basándose en la experiencia adquirida por el personal de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos y del Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias en estas materias.

1.6. Literatura consultada

Sharma, S. K., Saini, S., Verma, A., Sharma, P. K., Lal, R., Roy, M., Singh, U., Saxena A.K., & Sharma, A. K. (2019). National agriculturally important microbial culture collection in the global context of microbial culture collection centres. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(2), 405-418.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.

Smith, D. (2003). Culture collections over the world. *International Microbiology*, 6(2), 95-100.

WDCM (2019). WDCM CCINFO Cover. Retrieved December 28, 2019, from <http://www.wfcc.info/ccinfo/>.

World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. 06/11/2019, de World Federation for Culture Collections (WFCC) Sitio web: http://www.wfcc.info/pdf/Guidelines_e.pdf

WIPO (2010). World Intellectual Property Indicators 2018. Geneva: *World Intellectual Property Organization*, 113-115.

WIPO (2018). World Intellectual Property Indicators 2018. Geneva: *World Intellectual Property Organization*, 72.





2

**Conformación de una
colección de cultivos
microbianos**



Capítulo 2

Conformación de una colección de cultivos microbianos

Jean Franco Castro F.

Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

2.1. Requisitos mínimos para la conformación de una colección de cultivos microbianos

La protección de los recursos microbiológicos de un territorio es indispensable para resguardar el patrimonio genético y para promover el desarrollo de innovación en biotecnología. Garantizar la reproducibilidad de resultados publicados en revistas científicas, tesis y procesos industriales que utilizan microorganismos, sólo se logra mediante la correcta preservación de estos en una colección de cultivos microbianos.

Una colección de cultivos puede establecerse desde cero o desde una colección microbiana preexistente, originada a partir de algún proyecto de investigación o heredada de un investigador, la que sirve de núcleo para iniciar la colección de cultivos formalmente. Para la conformación de una colección de cultivos microbianos, en primer lugar, se deben establecer los objetivos de la colección, los cuales siempre deben ser de largo plazo. Luego, es importante establecer los presupuestos que garanticen la operatividad de sus instalaciones y de sus procesos (contratación de personal, adquisición de equipos de laboratorio, mantención de equipos, etc.) y, posteriormente, se debe buscar un financiamiento estable, el cual puede provenir desde alguna agencia del gobierno, empresa o universidad. Se debe disponer de un espacio físico, destinado al manejo de la colección de cultivos, en el cual los microorganismos que estén en proceso de preservación sean manipulados sólo por personal especializado y así garantizar la inocuidad del proceso, la seguridad del personal y la del entorno.

El equipamiento que se debe adquirir debe estar en función de las actividades a desarrollar en la colección de cultivos, las cuales van desde el aislamiento, caracterización, identificación, almacenamiento e indexación de los microorganismos en un catálogo. Es importante seleccionar rigurosamente al personal que forma (o formará) parte de la colección de cultivos, ya que debe tener sólidos conocimientos en microbiología, taxonomía microbiana, bioseguridad y biotecnología; también experiencia en el manejo de instrumental de laboratorio y preparación de medios de cultivo.

El objetivo de este capítulo es informar al lector sobre los aspectos mínimos necesarios para la conformación de una colección de cultivos microbianos, haciendo énfasis en definir las unidades funcionales que la conforman (Figura 2.1.).



Figura 2.1. Principales consideraciones sobre la conformación de una colección de cultivos microbianos.

2.2. Organización del personal

Las colecciones de cultivos son demandantes de trabajo. Desde su génesis se debe determinar el número de puestos de trabajo de tiempo completo y parcial para garantizar el cumplimiento de las labores necesarias que requiere una colección de cultivos. Por ejemplo, la preservación de microorganismos requiere de personal con conocimientos técnicos en microbiología; la caracterización de estos requiere personal con experiencia en taxonomía microbiana, biología molecular, bioquímica, bioinformática y habilidades sobre el manejo de equipos de microscopía; para la documentación se requiere personal con conocimientos en computación y poseer capacitaciones en gestión de calidad. Se recomienda tener una persona dedicada a la relación con el público general y/o solicitantes de cepas y también una persona encargada de preparación y limpieza de material de laboratorio.

El personal de la colección de cultivos debe tener una estructura organizacional clara y con objetivos de trabajo definidos (Figura 2.2.). En la CChRGM, existen cargos que permiten dar cumplimiento a las actividades preservación y que podría servir de ejemplo para otras instituciones que quieran conformar una colección de cultivos (Cuadro 2.1.). El curador es el responsable de organizar y mantener la colección de cultivos y de dirigir a un grupo de personas entre los cuales está el gestor técnico y el técnico de laboratorio, quienes se encargan de ejecutar los procedimientos establecidos para el funcionamiento de la colección. A su vez, dependen del curador las personas en labores administrativas como el área de gestión administrativa y gestión de calidad. Si los recursos económicos disponibles no permiten contratar una persona en cada uno de los cargos señalados, se pueden compartir labores entre las personas que estén disponibles, teniendo presente que una de las principales tareas en una colección de cultivos es mantener el orden y seguimiento de los procesos que en ella se realizan.



Figura 2.2. Estructura organizacional de una colección de cultivos.

Cuadro 2.1. Cargos y funciones del personal que trabaja en una colección de cultivos microbianos.

Cargo	Función
Curador	Es el encargado de la colección de cultivos y de planificar, desarrollar y dirigir líneas de investigación y de manejo de las colecciones microbianas. Tiene comunicación directa con los depositantes y con todo el personal.
Gestor técnico	Se encarga, principalmente, de la operatividad de las actividades técnicas asociada al manejo de las colecciones microbianas preservadas en una colección de cultivo. Debe ser el interlocutor entre el personal técnico y el curador.
Técnico	Es el personal que se encarga de ejecutar las actividades técnicas en laboratorio, siguiendo procedimientos establecidos para el adecuado manejo del material genético preservado en una colección de cultivo; también debe notificar al gestor técnico cualquier falla en alguna de las unidades de la colección de cultivos. Tiene comunicación directa con el gestor técnico y con el curador.
Gestor administrativo	Se encarga de atender y gestionar las necesidades del personal y de los clientes en los ámbitos administrativo y de gestión de calidad. Tiene comunicación directa con los clientes, el curador, gestor de calidad y documentador.
Gestor de calidad	Persona a cargo de elaboración y actualización de los procedimientos documentados, de coordinar las auditorías internas y la supervisión de la implementación de las oportunidades mejoras, acciones preventivas y acciones correctivas. Tiene comunicación directa con el curador, técnicos y gestor administrativo y con el encargado de documentación.
Encargado de Documentación	Es quien ordena la información, tanto física como digital, y realiza los respaldos de forma periódica. También es el encargado de mantener el sitio web de la colección de cultivos. Tiene comunicación directa con el curador, gestor de la calidad y gestor administrativo.

2.3. Las instalaciones de una colección de cultivos microbianos

Una colección de cultivos, por definición, corresponde a un espacio físico destinado a la preservación de microorganismos, por tanto, debe poseer un lugar para la instalación de múltiples unidades funcionales donde se lleven a cabo diferentes procesos para cumplir con las actividades de preservación y curatoría propias de una colección de cultivos.

Definir cada uno de los espacios en función de las actividades a desarrollar es clave para planificar la adquisición del equipamiento necesario y garantizar la operatividad de las unidades. De acuerdo a la experiencia de la CChRGM, se han identificado seis unidades principales (Figura 2.3.): (i) aislamiento, (ii) preservación, (iii) microscopía e identificación morfológica, (iv) identificación molecular, (v) formulación de medios de cultivo y (vi) administración y documentación.



Figura 2.3. Unidades funcionales dentro de una colección de cultivos microbianos.

Cada una de las unidades de una colección de cultivos debe permitir el correcto desarrollo de las actividades, y deben estar conectadas de manera funcional, es decir, de forma que permita la realización de las actividades y el flujo sin obstáculos del personal. Estas unidades deben estar separadas de las áreas comunes tales como oficinas, sala de reuniones, sala de autoclave, áreas de trabajo y cafetería, ya que en estas últimas también transita personal no relacionado al trabajo de laboratorio y se realizan actividades ajenas al trabajo con microorganismos.

Cada unidad debe poseer un responsable (un técnico, por ejemplo), quién deberá informar al gestor técnico si existe alguna falla o problema con el funcionamiento de alguno de los equipos o reportar algún incidente; a su vez, el gestor técnico realizará acciones correctivas necesarias y dará aviso al curador de las fallas. Es importante enfatizar que dentro del presupuesto destinado a la colección de cultivos se deben considerar las mantenciones y renovación de los equipos.

A continuación, se detalla el quehacer y los equipos necesarios para la implementación de cada una de las unidades funcionales de una colección de cultivos microbianos.

2.3.1. Unidad de aislamiento

La obtención de un cultivo microbiano puro requiere la adquisición de una serie de equipos para manipular, de forma limpia y segura, el material microbiano y entregar las condiciones ambientales para favorecer el crecimiento del microorganismo.

Los gabinetes de bioseguridad son equipos que brindan una zona de trabajo libre de partículas o de probables contaminantes ambientales, evitando posibles alteraciones de la limpieza del material microbiológico con el que se está trabajando, disminuyendo los riesgos a la salud del personal y evitando daños al ambiente. Estos equipos proporcionan la primera barrera de contención frente a salpicaduras o aerosoles microbianos generados por diversos procedimientos en que se manipulan microorganismos. Se recomienda la instalación de este tipo de instrumentos en lugares que no estén propensos a corrientes de aire que puedan romper o alterar los patrones de flujo de aire del gabinete de bioseguridad; si estas corrientes externas exceden las velocidades de ingreso al gabinete a través de la abertura frontal, existe la posibilidad de que el aire contaminado entre o salga del área de trabajo del gabinete de bioseguridad, afectando la protección del personal, de la muestra y el ambiente.

En una colección de cultivos se trabaja con microorganismos aislados desde diversas fuentes. Muchas veces se desconoce si el microorganismo representa un peligro para un trabajador o para el ambiente, por tanto, se recomienda la adquisición de un gabinete de bioseguridad de clase II de frente abierto (Foto 2.1.).



Foto 2.1. Gabinete de bioseguridad clase II de frente abierto usado en la unidad de aislamiento.

Para un adecuado uso de un gabinete de bioseguridad se debe planear el trabajo y los procedimientos a realizar dentro del equipo. Se recomienda desinfectar las superficies con etanol al 70%, luego irradiar con luz ultravioleta el interior del gabinete por aproximadamente 20 minutos, antes de encender el equipo; cargar los materiales en el interior del gabinete, ubicándolos en lugares que no obstaculicen el flujo de aire al interior de éste. Una vez finalizado el procedimiento se deben descargar los materiales, desinfectar la cabina de seguridad y apagarla.

Los microorganismos requieren de condiciones de temperatura específica para desarrollarse y crecer de forma óptima. Una colección de cultivos debe considerar la adquisición de cámaras de incubación para realizar la incubación de cultivos microbianos de forma estática, es decir, sin movimientos, y que permitan al usuario programar la temperatura requerida para cada tipo de microorganismo, por un período indefinido. Se debe tener presente que los microorganismos pueden tener rangos de temperatura óptima, por lo que se recomienda considerar equipos que puedan aumentar la temperatura interior por sobre la temperatura ambiente y otros que puedan disminuir la temperatura de la estufa por debajo de la temperatura ambiente (Foto 2.2.A.). Se recomienda utilizar la cámara sobre un mesón firme y nivelado, capaz de sostener el peso de la incubadora; el interior de la cámara no debe contener líquidos inflamables ni corrosivos y sólo debe ser utilizado para fines microbiológicos (Foto 2.2.B.).

Otras técnicas de cultivo incluyen la incubación del microorganismo mediante la agitación del medio de cultivo inoculado, estos son equipos especializados que están compuestos por una plataforma que se mueve de forma circular en el plano horizontal a un determinado número de revoluciones por minutos, permitiendo la homogeneización y aireación del cultivo (Foto 2.2.C). Existen agitadores orbitales que poseen sistema de control de temperatura incorporada y otros sin ese sistema, los cuales son usados para incubación a temperatura ambiente.

Existen grupos microbianos que poseen requerimientos especiales de gases, por ejemplo, los microorganismos anaeróbicos, que crecen en ausencia de oxígeno, o los microorganismos microaerófilos, que crecen en con niveles bajos de esta molécula, por tanto, se recomienda la adquisición de un jarro de anaerobiosis junto con un sistema de generación de atmósferas libres de oxígeno.



Foto 2.2. Incubadoras para microorganismos usadas en la unidad de aislamiento. (A) izquierda, incubadora con control de temperatura por sobre la del ambiente, derecha, incubadora con control de temperatura por debajo de la temperatura ambiente; (B) incubación de microorganismos en una incubadora; (C) incubación de cultivos líquidos en un agitador orbital sin sistema de control de temperatura.

2.3.2. Unidad de preservación

La preservación de microorganismos de forma pura y viable es una de los objetivos principales de una colección de cultivos. La *World Federation for Culture Collections* (WFCC), cuyo objetivo es promover y apoyar el establecimiento de colecciones de cultivo, indica que las colecciones de microorganismos deben ser preservadas por al menos dos métodos para asegurar su viabilidad a lo largo del tiempo. Los métodos más utilizados en el mundo son la liofilización y la criopreservación (Foto 2.3.).

La liofilización es el secado en frío de una solución microbiana congelada. El fundamento de esta técnica se basa en la sublimación del agua en estado sólido a muy baja presión, lo cual se lleva a cabo en un equipo llamado liofilizador, conectado a una bomba generadora de vacío. Existen varias configuraciones para estos equipos; en la CChRGM se utiliza el sistema de viales de vidrio sellados con tapones de goma. También hay configuraciones que permiten el uso de ampollas de vidrio para realizar el almacenamiento de los microorganismos. Para almacenar las cepas de forma segura, se recomienda adquirir gavetas metálicas resistentes a golpes.

La preservación por congelación requiere de congeladores que puedan disminuir la temperatura de su interior hasta alcanzar temperaturas entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recomienda que los equipos de criopreservación estén en una sala especial, equipada con un sistema de aire acondicionado para mantener la temperatura de la sala en torno a los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, debido a que estos equipos liberan calor, elevando la temperatura de la sala en torno a los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual no es recomendado para el buen funcionamiento de los mismos (Foto 2.3.B.). Un segundo método de congelación es la utilización de nitrógeno líquido que permite alcanzar temperaturas inferiores a $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para ello es necesario comprar un tanque para almacenar nitrógeno líquido y suministrarlo periódicamente.

Al momento de planear la adquisición de un congelador, tanque de nitrógeno líquido o gavetas para almacenar liofilizados, se debe proyectar el número de cepas a preservar. El número de cepas microbianas que pueden ser almacenadas en estos sistemas depende del volumen del interior del equipo o mueble; para realizar el cálculo se sugiere considerar lo siguiente:

En el caso de un congelador tenga en cuenta:

$$\text{N}^{\circ} \text{ cepas a preservar} = \text{N}^{\circ} \text{ de gradillas total que alcanzan en el interior del congelador} \times \text{N}^{\circ} \text{ de cajas criogénicas que alcanzan por gradilla} \times \text{N}^{\circ} \text{ de viales criogénicos que alcanzan por caja} \div \text{N}^{\circ} \text{ de copias por cepa preservada.}$$

En el caso de gavetas para almacenar los productos liofilizados se debe considerar:

$$\text{N}^{\circ} \text{ cepas a preservar} = \text{N}^{\circ} \text{ de cajones que tiene la gaveta} \times \text{N}^{\circ} \text{ de compartimentos internos por cajón} \times \text{N}^{\circ} \text{ de viales de vidrio que alcanzan por compartimento} \div \text{N}^{\circ} \text{ de copias por cepa preservada.}$$

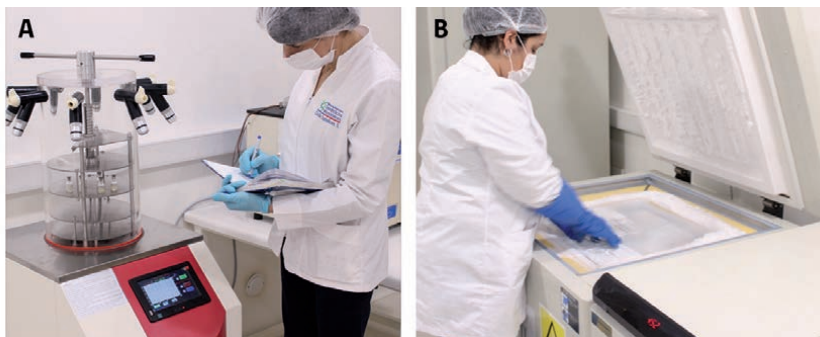


Foto 2.3. Equipos para la unidad de preservación de microorganismos. (A) Liofilizador; (B) congelador de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3. Unidad de microscopía e identificación morfológica

Los microscopios son esenciales en una colección de cultivo ya que son un apoyo para las labores de identificación de estructuras morfológicas asociadas a un género o especie microbiana, y también permiten la identificación de posibles contaminantes en un cultivo microbiano. Los microscopios son instrumentos ópticos que permiten la visualización del mundo microbiano ya que producen imágenes amplificadas de las estructuras celulares o de una colonia bacteriana o de hongo.

El microscopio básico que se puede encontrar en un laboratorio es el microscopio de luz, el cual permite observar al microorganismo completo con un aumento de hasta 1000 a 1500 veces. A través de él se pueden visualizar las estructuras celulares con definición de bordes, lo cual es fundamental para la descripción morfológica de un microorganismo. Se recomienda adquirir un microscopio con un sistema de documentación de fotografía digital integrado para mantener un registro de los microorganismos analizados (Foto 2.4.A.).

Otro instrumento importante en una unidad de microscopía es el estereomicroscopio, el cual provee una amplificación de hasta 300 veces el tamaño de un objeto. Es un microscopio tipo binocular, utilizado para visualizar objetos opacos, como una colonia microbiana, o aquellos objetos que son grandes y que el campo visual del microscopio de luz no permite visualizar. No se requiere realizar una preparación del cultivo microbiano sobre un portaobjeto, ya que los objetos son visualizados directamente. Con este tipo

de instrumento se puede analizar la textura de la superficie de las colonias microbianas, distinguir estructuras como cuerpos fructíferos o permitir manipulación de ésta durante su estudio, por ejemplo, realizar subcultivo de hongos por la técnica de punta de hifa (Foto 2.4.B.).

Las lupas para conteo de colonias son utilizadas para registrar las colonias bacterianas aisladas, creciendo sobre un medio de cultivo en placa Petri para calcular el número de unidades formadoras de colonia por mL. Este instrumento posee una superficie de apoyo iluminada desde abajo y una lupa permite el conteo de los cultivos de bacterias con precisión. El instrumento incluye un sensor de presión que registra la presión ejercida, transformando la señal en un número que se mostrará en la pantalla LED (Foto 2.4.C.).



Foto 2.4. Unidad de microscopía. (A) Microscopio óptico de luz; (B) estereomicroscopio; (C) contador de colonias.

2.3.4. Unidad de identificación de molecular

Conocer el género y/o la especie a la que pertenece un microorganismo es fundamental para depositarlo en una colección de cultivos. Normalmente, una colección de cultivos fija ciertas restricciones sobre la admisibilidad de algunos géneros microbianos que puedan ser patógenos (o potencialmente patógenos) de humanos o animales, convirtiendo a la identificación molecular de microorganismos en una herramienta para asegurar la autenticidad del depósito. La estrategia utilizada para la identificación molecular es la secuenciación de genes discretos mediante método de secuenciación Sanger; los genes son amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN genómico extraído desde el microorganismo. Posterior a la secuenciación se realiza un procesamiento bioinformático de la calidad de las secuencias, para lo cual se requiere de un computador.

Dentro de los equipos básicos necesarios para montar la unidad de identificación molecular está el termociclador, el cual permite realizar ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas zonas del ADN de un microorganismo a través de la PCR (Foto 2.5.A). Un espectrofotómetro para con capacidad de medir en el rango ultravioleta para cuantificar la concentración de ADN. Una cámara de electroforesis junto a una fuente de poder es necesaria para separar las secuencias nucleotídicas amplificadas en la PCR (Foto 2.5.B.). Un transiluminador con emisión de luz UV permite la visualización de ADN correspondiente a bandas de ADN (Foto 2.5.C.). Para la secuenciación de genes, en caso de no contar con financiamiento para la compra de un secuenciador Sanger, se puede hacer uso de los servicios ofrecidos por terceros como en universidades o empresas.

Los métodos para extracción de ADN tradicionales utilizan sustancias y solventes que emiten olores y vapores que pueden ser perjudiciales para la salud del trabajador y de las personas que lo rodean. Para trabajar con este tipo de sustancias, se recomienda adquirir e instalar una cámara de extracción de gases para evitar la contaminación en el laboratorio y proteger al personal de inhalaciones en donde se generan gases tóxicos.



Foto 2.5. Equipamiento para realizar identificación molecular de microorganismos. (A) Termociclador empleado para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (B) fuente de poder y cámara de electroforesis para la separación de secuencias de ADN; (C) transiluminador para visualización de bandas de ADN.

2.3.5. Unidad de formulación de medios de cultivo

Cada microorganismo posee requerimientos nutricionales especiales, por ejemplo, diferentes fuentes de carbono, sales, vitaminas, condiciones de pH, etc.

Una colección de cultivos debe contar con una sala especial para el almacenamiento de los reactivos o sustancias para la preparación de medios de cultivo, tomando en consideración que cada uno de estos posee características

de almacenamiento o grados de toxicidad diferentes, lo que implica que algunas sustancias deben estar separadas o deben ser almacenadas a cierta temperatura. Es importante considerar que cada sustancia química tiene su Ficha de Datos de Seguridad (o *Material Safety Data Sheet*) la cual detalla sus propiedades, recomendaciones sobre su manipulación y los potenciales peligros asociados a su manipulación. Por ejemplo, los solventes inflamables deben estar separados de los ácidos y en gabinetes especialmente diseñados para esos fines, se recomienda la compra de gabinetes de seguridad para almacenar solventes. Para los reactivos en seco, se debe disponer de un catálogo de sustancias, dispuestas de forma ordenada y en orden alfabético en una repisa, además de un inventario de reactivos con su respectiva ficha de seguridad disponible para los usuarios del laboratorio y personal de emergencia, en caso de ocurrir una emergencia química (Foto 2.6.A.).

La unidad de formulación de medios de cultivos debe contar con balanzas para pesar cada componente del medio de cultivo (Foto 2.6.B.). La mayoría de los medios de cultivos son disueltos con agua destilada, por tanto, también se debe considerar la instalación de un destilador de agua. Finalmente, se debe contar con un autoclave instalado en una sala especial (Foto 2.6.C.), el cual antes de ser usado en el laboratorio debe tener su certificación y registro en el Servicio de Salud al día (según la norma chilena, si el autoclave supera los 50 L de volumen debe estar registrado). Es importante que el personal que maneje el autoclave tenga una capacitación formal de su uso, conocer los peligros y reportar cualquier indicio de falla a la persona encargada de esta unidad, gestor técnico o al curador. Se recomienda disponer de más de un autoclave con una capacidad entre 50 y 100 L y destinar uno de ellos para la esterilización de material de laboratorio y medios de cultivos usados para la manipulación de microorganismos y otro para la esterilización de material biológico de desecho que debe ser esterilizado antes de ser eliminado.



Foto 2.6. Unidad de formulación de medios de cultivos microbianos. (A) Estante que contiene las sustancias ordenadas en orden alfabético; (B) balanza para pesar cada sustancia; (C) sala de autoclaves.

2.3.6. Unidad de administración y documentación

La unidad de administración y documentación tiene la función de mantener un registro físico y digital de todos los microorganismos que ingresan al sistema de preservación o que son distribuidos a terceros, así como mantener un registro de todos los procedimientos y protocolos llevados a cabo por el personal de la colección de cultivos. Esta unidad debe estar separada del resto de los laboratorios, ya que principalmente la componen oficinas en que se desempeña personal que no trabaja manipulando microorganismos.

En el caso de administración, la persona encargada debe tener conocimientos de manejo intermedio de planilla de cálculos, programas de edición de texto y de presentación. Es recomendable que esta persona mantenga la comunicación entre los clientes y el curador, tenga conocimientos de inglés intermedios o, idealmente, avanzados, y lleve un registro financiero de los ingresos y gastos de dinero; además debe gestionar la compra de insumos, coordinar visitas técnicas y llevar un registro de todas las personas que visitan las instalaciones de la colección de cultivos.

La persona encargada de gestión de calidad debe supervisar que todos los procedimientos se lleven a cabo en conformidad a lo estipulado en estos, realizar auditorías internas y realizar capacitaciones constantes al personal en ámbitos relacionados a brindar un mejor servicio tanto a los clientes internos (de la misma institución) como de clientes externos. La persona encargada de documentación trabaja en conjunto con la persona encargada de administración y de gestión de calidad, dando soporte informático y de revisar los registros internos.

2.4. Actividades llevadas a cabo en una colección de cultivos microbianos

Una vez definidas las unidades funcionales de la colección de cultivos se puede dar inicio a las actividades de aislamiento, preservación, verificación de viabilidad, identificación de microorganismos, distribución, documentación y otros servicios. Cada una de estas actividades se detalla a continuación.

2.4.1. Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos es una actividad basal de una colección de cultivos, permitiéndole ampliar o enriquecer la colección microbiana. Todo aislamiento de microorganismos se basa en la colecta de las muestras ambientales (suelo, agua, planta, insecto, entre otros), la cual debe ser planeada con antelación y con un objetivo claro: ¿Qué se desea aislar? ¿Qué se quiere preservar? ¿Qué lugar y qué huésped colectar? Existen protocolos específicos para la colecta, manipulación y aislamiento de microorganismos desde las muestras.

Antes de realizar el aislamiento de microorganismos, se recomienda realizar una búsqueda bibliográfica acabada de metodologías de aislamiento para evaluar si las capacidades técnicas del personal y de las unidades de la colección de cultivos permitirían realizarlo, por ejemplo, algunos microorganismos poseen requerimientos de gases o de ciertos nutrientes o del uso de filtración para garantizar el enriquecimiento de un grupo microbiano deseado. Se recomienda adquirir libros con recetas de medios de cultivos para diferentes géneros microbianos (Atlas 2010), lo cual puede ser muy útil a la hora de consultar alguna formulación de medio de cultivo; a su vez, las colecciones de cultivos deben mantener una lista de medios de cultivo para mantener las cepas depositadas.

Es importante mencionar que todo microorganismo debe tener los siguientes registros: fecha de colecta de sustrato, tipo de sustrato, coordenadas geográficas del lugar de colecta, nombre de la persona que coleccionó la muestra, fecha de aislamiento, identificación al menos al nivel de género, asignación de código de aislamiento, medio de cultivo para su crecimiento incluyendo, tiempo y temperatura de incubación.

2.4.2. Almacenamiento de microorganismos

Mantener los cultivos puros y viables por períodos prolongados es una de las misiones de una colección de cultivos. Evitar la contaminación del cultivo preservado y reducir los cambios genéticos en éstos es primordial para garantizar la reproducibilidad de los procesos en que se utiliza material genético microbiano. Normalmente, en laboratorios que no tienen protocolos establecidos para la preservación de microorganismos a largo plazo, se

realiza la transferencia periódica de los cultivos a un medio de cultivo fresco para permitir la continuidad de la viabilidad del cultivo. Este tipo de práctica está condicionada por la calidad de las condiciones de trabajo para evitar la contaminación del cultivo y a las capacidades técnicas de la unidad de preservación. A medida que una colección de cultivo crece, la labor de subcultivar se vuelve más intensa y se puede tornar inviable cuando existe un gran número de cultivos puros que se deben preservar por largos períodos de tiempo. Adicionalmente, con la aplicación de esta técnica, existen riesgos de cambios genéticos, así como de contaminación.

De esta forma, los métodos de preservación se pueden agrupar en dos categorías: (i) metabólicamente inactivos y (ii) metabólicamente activos. Para el caso de los métodos metabólicamente inactivos existe preservación por congelación (criopreservación) y la de secado en frío (liofilización). En la criopreservación, el microorganismo es congelado y almacenado a temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual es logrado con un equipo de ultra-congelación; también se utiliza nitrógeno líquido como segundo respaldo, logrando temperaturas de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, están los métodos metabólicamente activos, que involucran la transferencia periódica del microorganismo en medio de cultivo fresco o en agua. Estos métodos son usados cuando la criopreservación o liofilización no funcionan para el microorganismo.

La unidad de preservación de una colección microbiana debe tomar en cuenta que cada una de estas estrategias tiene ventajas y desventajas (Cuadro 2.2). Esta unidad debe estar preparada para recibir donaciones de cepas microbianas, ya sea internas de la misma institución o externas.

Cuadro 2.2. Ventajas y desventajas de los sistemas de preservación metabólicamente activos (A) y metabólicamente inactivos (B).

A. Métodos de preservación metabólicamente activos	
Ventajas	Desventajas
Método simple y no se requiere equipamiento especializado.	Alto riesgo de contaminación.
Cultivo fácil de recuperar.	Pueden existir cambios en las características genéticas y bioquímica del microorganismo.
B. Métodos de preservación metabólicamente inactivos	
Ventajas	Desventajas
Garantiza largos períodos de preservación.	Requiere equipamiento sofisticado para la preservación.
Mantiene a los microorganismos con casi nula actividad metabólica y casi nulos cambios a nivel genético.	Requiere personal capacitado para realizar estas labores.
Disminuye el riesgo de contaminación.	Se requiere realizar varios pasos para la regeneración del cultivo.

2.4.3. Evaluación de viabilidad de microorganismos

La viabilidad de los microorganismos debe ser evaluada posterior al tratamiento de preservación aplicado al microorganismo, y así determinar si éste toleró el tratamiento de preservación. Para llevar esto a cabo se deben considerar criterios para la evaluación de viabilidad. Para el caso de bacterias se utiliza el conteo de unidades formadoras de colonias, mientras que para el caso de hongos se deben considerar el número de esporas germinadas. La evaluación de viabilidad es un proceso constante, el cual se debe ir monitoreando cada cierto período de tiempo.

2.4.4. Identificación de microorganismos

La identificación de los microorganismos hasta nivel de género y especie se debe realizar a través estrategias complementarias. Una de ellas es mediante el uso de claves taxonómicas en base a descripción de rasgos morfológicos y la otra es mediante la identificación molecular, realizando secuenciación de uno o varios genes desde una muestra de ADN. Para esto, se requiere que el microorganismo a identificar esté puro.

En muchos casos es posible que la estrategia de identificación no permita diferenciar entre dos especies muy similares, por lo que se recomienda depositar el microorganismo, sólo reportando una identificación a nivel de género, donde el nombre de la especie no es especificado, por ejemplo, *Streptomyces* sp.

2.4.5. Distribución de microorganismos a terceros

Las colecciones de cultivos distribuyen microorganismos a terceros que acrediten pertenecer a una institución con equipamiento y personal capacitado para una manipulación correcta y segura del material biológico, por ejemplo, se deberían aceptar solicitudes de universidades, centros de investigación, empresas, etc. Cuando se realiza la solicitud de material, se debe preguntar la cantidad de material biológico requerida y la dirección de despacho. Si el envío se realiza fuera de Chile, el solicitante debe realizar trámites de autorización de internación en el país de destino, previo al envío del material. Las cartas de autorización de internación de un depósito deben ser enviadas al gestor administrativo para llevar un registro y entregadas al curador para adjuntar dicho respaldo en la encomienda.

Una colección de cultivos debe considerar la elaboración de un documento contractual llamado Acuerdo de Transferencia de Material (ATM), que contiene una serie de cláusulas sobre las restricciones y los alcances del uso de un microorganismo a distribuir. Este documento debe ser firmado, tanto por el solicitante del microorganismo, como por el curador. El solicitante debe ser una persona con responsabilidad administrativa dentro de la entidad solicitante y tener presente que, una vez finalizado el ATM, el material biológico debe ser destruido (o devuelto al proveedor), pero nunca almacenado o distribuido a alguien fuera del acuerdo.

Las distribuciones de microorganismos deben tener un costo asociado, el cual se calcula en relación al tiempo empleado por los técnicos, los insumos utilizados y los gastos de administración cobrados por la institución. Se recomienda la elaboración de un catálogo en línea con los microorganismos disponibles para distribución, detalle de precios y restricciones de uso. Una colección de cultivos no vende microorganismos.

2.4.6. Documentación y gestión de calidad

Todos los procesos realizados en una colección de cultivos deben estar debidamente diseñados, establecidos y documentados. Todos proceso, procedimiento o instructivo debe describir paso a paso lo que se debe realizar frente a un tema global, debe tener fecha de elaboración y de vigencia y el nombre de un encargado.

Para llevar registro de los depósitos de cepas, se debe disponer de un formulario de ingreso de cepas (Forma de Adhesión), en el cual se solicita información relacionada a la identificación del microorganismo, nivel de riesgo de bioseguridad, requerimientos nutricionales, lugar y fecha de colecta, nombre colector, información sobre genes secuenciados, etc. Además, se deben documentar todas las solicitudes recibidas, incluyendo las solicitudes rechazadas y las razones del rechazo. Es conveniente registrar toda la información en una hoja de cálculo para poder acceder de forma rápida a la información.

2.4.7. Otros servicios

Las colecciones de cultivos pueden ofrecer servicios de apoyo a la comunidad científica o a la industria en los cuales se aprovecha la experiencia y habilidades del personal que trabaja en la colección de cultivos. Los servicios típicamente ofrecidos son identificación molecular de microorganismos, aislamiento de microorganismos a solicitud, servicios de preservación a mediano y largo plazo a través de criopreservación o liofilización, distribución de microorganismos, ofrecer capacitaciones en los ámbitos de trabajo de una colección de cultivo. Todo esto con una tarifa asociada.

2.5. Aspectos de bioseguridad y orden en el laboratorio

El personal a cargo de la colección de cultivos debe elaborar un Manual de Bioseguridad, en el cual se indique las actividades permitidas y no permitidas para una segura y correcta manipulación del material biológico. En términos generales, para el trabajo de laboratorio se debe considerar el uso de cubre calzados o calzado de laboratorio de uso exclusivo dentro de las dependencias de la colección, delantal blanco y abrochado para prevenir la contaminación

de la vestimenta personal. Idealmente, deben existir casilleros en el cual se mantenga la ropa de laboratorio separada de la ropa de calle. Mantener el cabello recogido o protegido dentro de un gorro o cofia; mantener controlado el flujo de personas en el laboratorio, evitar movimientos bruscos y rápidos (se prohíbe correr). No está permitido fumar, comer o beber, ni aplicarse cosméticos dentro del laboratorio. No se deben colocar objetos personales sobre la mesa de trabajo, no utilizar teléfonos celulares cuando se manipulan microorganismos, no usar los refrigeradores, ni las estufas para conservar o calentar alimentos, respectivamente. Lavarse siempre las manos al llegar y antes de abandonar el laboratorio. Desinfectarlas cuando sea necesario. Para secarlas, usar toallas desechables o aire caliente seco. No hacer uso del delantal ni de pañuelos para limpiar objetos o instrumentos de trabajo.

Los desechos biológicos deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados en la basura convencional, se recomienda utilizar bolsas especiales para estos fines, que tienen la insignia de riesgo biológico y esterilizar a 121 °C por, al menos, 45 minutos (Foto 2.7.). En caso de cualquier incidente o sospecha de riesgo químico, microbiológico o físico, comunicar al gestor técnico o al encargado de laboratorio.



Foto 2.7. Eliminación de material de laboratorio mediante esterilización en autoclave. El material biológico debe estar en bolsas con la insignia de riesgo biológico.

2.6. Literatura consultada

Atlas, R. (2010). Handbook of Microbiological Media. Boca Raton: CRC Press.

Organización Panamericana de la Salud (2002). Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington, D.C.

Sharma, S. K., Saini, S., Verma, A., Sharma, P. K., Lal, R., Roy, M., Singh, U., Saxena A.K., & Sharma, A. K. (2019). National agriculturally important microbial culture collection in the global context of microbial culture collection centres. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(2), 405-418.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.

Smith, D. (2003). Culture collections over the world. *International Microbiology*, 6(2), 95-100.





3

**Gestión de calidad
en las colecciones de
cultivos microbianos**



Capítulo 3

Gestión de calidad en las colecciones de cultivos microbianos

Lorena Barra Bucarei

Ingeniero Civil Industrial, Ingeniero Agrónomo, Mg., Dra.

INIA Quilamapu

3.1. Importancia de implementar un sistema de gestión de calidad en una colección de cultivos microbianos

En un mundo cada vez más cambiante y en constante amenaza de escasez alimentaria, los recursos genéticos constituyen un patrimonio de la humanidad de valor incalculable y la base de la seguridad alimentaria mundial de las personas y animales del planeta. Se entiende por recursos genéticos a "todo el material genético de valor real o potencial incluidos el de las plantas, animales y microorganismos" (Convenio sobre Diversidad Biológica, 1992) y su pérdida es un proceso irreversible que se traduce en una importante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo.

Chile es un importante centro de la diversidad biológica, lo cual es producto de la adaptación de sus especies a los distintos ambientes que el país posee, reflejándose en un alto número de especies endémicas y una alta diversidad intraespecífica de sus especies. Una importante cantidad de esta biodiversidad fitogenética se encuentra resguardada en la Red de Bancos de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), cuya colección de recursos fitogenéticos posee más de 30 años de antigüedad.

Sin embargo, INIA aborda la preservación de los recursos microbianos con un carácter oficial cuando Chile adhiere al Tratado de Budapest y se crea la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) en el año 2012, colección designada como Autoridad Internacional de Depósito (IDA) por

parte de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI). Lo anterior tiene una gran relevancia si se considera que hoy en día las colecciones de cultivos microbianos son fundamentales para la preservación de la biodiversidad, así como fuente de material para el desarrollo biotecnológico con aplicación multisectorial.

En la actualidad es fundamental que las colecciones de cultivos microbianos garanticen que los microorganismos depositados mantengan sus propiedades en el largo plazo. Dado lo anterior, los procedimientos y protocolos que son implementados en estas colecciones deben asegurar la calidad del producto, entregando materiales de referencia que permitan obtener resultados reproducibles. En la literatura científica, existen varios documentos que abordan los procesos técnicos asociados, principalmente a la preservación, que apoyan la gestión de las colecciones de cultivos microbianos. Sin embargo, son pocos los documentos que abordan la gestión de una colección de cultivos microbianos de manera integral.

En la década de los ochenta, la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC) elaboró el documento: "Lineamientos para el Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos", como una guía general que puede ser aplicada a colecciones de cultivos, sin importar su tamaño y condición (privada o pública). Actualmente se encuentra vigente la Tercera Edición elaborada en 2010. En Argentina existe la norma IRAM 14950:2010: "Cultivos Microbianos de Referencia", en la cual se establecen los requisitos normativos que debe cumplir un proveedor de material de referencia microbiológico.

Tomando como base los lineamientos de la WFCC y pensando en garantizar la calidad de los servicios prestados en una colección de cultivos microbianos, se hace necesario trabajar con altos estándares de calidad que idealmente deben ser certificados y/o acreditados mediante normas nacionales e internacionales. Existen varias normas de aseguramiento de calidad que pueden ser utilizadas por las colecciones de cultivos microbianos, como la internacional ISO 9001:2015 y la chilena NCh 17.025. Sin embargo, aún no existe un sistema de acreditación diseñado particularmente para colecciones de cultivos.

En 2014, la CChRGM diseñó e implementó un sistema de gestión de calidad (SGC), atendiendo a los lineamientos del documento de la WFCC y con miras a alcanzar la acreditación mediante la NCh 17.025 como punto de partida para cuando la institución (INIA) decidiera certificarse bajo la norma internacional ISO 9001-2015. Esta última contiene un conjunto de requisitos aplicables a cualquier tipo de organización con un enfoque hacia la eficacia del sistema (ISO, 2015). El diseño de un SGC tiene como objetivo mejorar la gestión integral y garantizar, a sus partes interesadas, la calidad del material genético conservado y la calidad de los servicios ofrecidos.

Dado lo anterior, el propósito de este capítulo es entregar información, basada en la experiencia de la CChRGM, para el diseño e implementación de un sistema de gestión de calidad de manera de garantizar a las partes interesadas la calidad de los materiales conservados y de los servicios prestados (Figura 3.1).

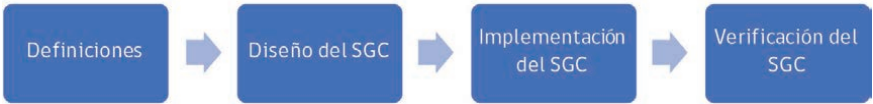


Figura 3.1. Principales consideraciones sobre la implementación de un sistema de gestión de calidad (SGC).

3.2. ¿Qué es un SGC?

Actualmente la calidad se ha convertido en un factor estratégico para la superveniencia y expansión de las organizaciones, y las colecciones de cultivos microbianos no están ajenas a esto. Tanto los “Lineamientos para el Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos” de la WFCC, como los “Lineamientos sobre Buenas Prácticas en Biocustodia para los Centros de Recursos Biológicos”, elaborada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), mencionan la gestión de calidad como fundamental para atender los requerimientos de los clientes en materia de preservación de material genético.

Un SGC corresponde a un conjunto de elementos interrelacionados de una organización que tiene por objetivo administrar de forma planificada la calidad de la misma, apuntando a aumentar el grado de satisfacción de sus clientes internos y externos (Figura 3.2.). Estos sistemas tienen como ventaja el control

continuo de los procesos individuales y colectivos, la toma de decisiones basada en hechos y la mejora continua. Con la implementación de estos sistemas se busca lograr no sólo la eficacia de sus procesos, sino la eficacia de su gestión. En el caso de las colecciones de cultivos microbianos, el objetivo del SGC es garantizar la preservación y el suministro de los materiales biológicos allí preservados, cuando sean requeridos.

Para diseñar e implementar un SGC es necesario realizar un diagnóstico de la situación actual de la colección de cultivos microbianos, en donde quede de manifiesto la necesidad de implementar un sistema de gestión de calidad y se defina su alcance. El diagnóstico debe ser debidamente planificado, ejecutado y documentando, ya que debe servir de línea de base para abordar los distintos aspectos en la gestión, tales como los objetivos, personal, preservación y otros servicios prestados, financiamiento, documentación, capacitación, seguridad, bioseguridad, entre otros aspectos. Con la información del diagnóstico se deberá comenzar el diseño del SGC.

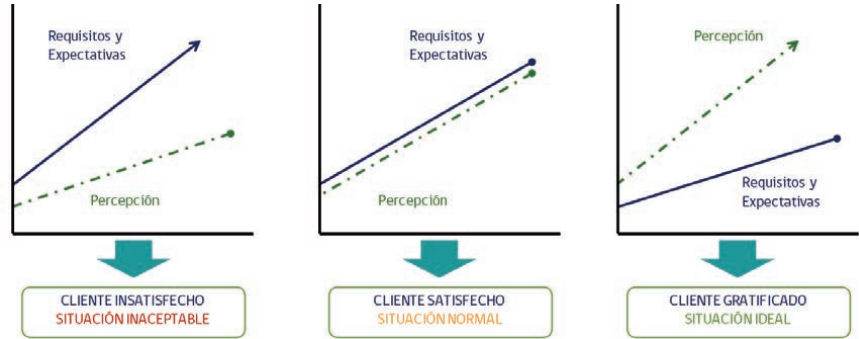


Figura 3.2. Grado de satisfacción de los clientes.

3.3. Etapas para el diseño de un SGC

3.3.1. Creación del equipo de trabajo responsable de diseño e implementación

La conformación de un equipo *ad hoc* para el diseño del SGC, debe considerar personas idóneas para este tipo de trabajo y, en lo posible, capacitadas en el ámbito de la gestión de calidad. De no contar con personal con conocimiento en el ámbito, se recomienda contratar servicios externos. Además, se deben incluir en el equipo al personal técnico que complementará con el conocimiento acabado de los procesos que se realizan dentro de la colección de cultivos. Una vez conformado el equipo, se deberán asignar roles y funciones, ya que son varias las actividades que se abordarán, destacando: revisión de documentos, entrevistas con el personal de la colección de cultivos microbianos y sus clientes; sistematización y análisis de la información recopilada; supervisión de las tareas asignadas y la entrega de información a los tomadores de decisiones.

3.3.2. Identificación de las necesidades de las partes interesadas internas y externas (clientes)

Se recomienda realizar entrevistas y reuniones con las partes interesadas para hacer una adecuada investigación sobre sus necesidades y expectativas. También se puede recurrir al uso de encuestas debidamente diseñadas en función a los resultados que se espera obtener de ellas. La información recolectada debe ser analizada en profundidad (idealmente mediante el uso de métodos estadísticos) y debe permitir establecer algunas métricas que permitan, en el futuro, medir el grado de satisfacción. En el caso de la CChRGM, se trabajó con un equipo de técnicos y profesionales los cuales fueron capacitados en el ámbito de la gestión de calidad.

3.3.3. Identificación de los procesos y procedimientos del SGC

En función a las necesidades de las partes interesadas, se deberán identificar los procesos y procedimientos del sistema, con los cuales se recomienda conformar

un mapa de procesos con sus entradas y salidas. Por ejemplo, en la CChRGM se estableció un mapa de procesos, considerando las recomendaciones de la norma ISO 9001, donde se establecen procesos de gestión estratégica, operativos, de soporte, y de medición, análisis y mejoramiento continuo (Figura 3.3.).



Figura 3.3. Mapa de procesos de la CChRGM.

Además, en la CChRGM se definió como proceso operativo el de “Preservación” que involucra ocho procedimientos técnicos (Figura 3.4.). De éstos, dos fueron considerados críticos debido a que son los que conectan directamente con los clientes como el de “Adquisición” y el de “Distribución” (Cuadro 3.1.).

Cuadro 3.1. Procedimientos y alcances en el SGC implementado en la CChRGM.

Procedimiento	Alcance
Adquisición	Considera el ingreso de accesiones de microorganismos específicos para formar parte de la colección en su estatus de pública, privada y privada IDA. Los microorganismos pueden provenir de colectas, donaciones e intercambios.
Procesamiento primario de muestras	Se basa en la verificación de viabilidad y pureza de las accesiones de microorganismos contenidos en las muestras ingresadas a la Colección. También se aplica para los aislamientos de microorganismos de muestras que provengan de colectas realizadas por la misma colección.
Almacenamiento o preservación	El objetivo es preservar las accesiones de microorganismos a través de, a lo menos, dos sistemas de preservación (criopreservación, liofilización y otros).
Monitoreo	Se determina periódicamente el estado de preservación de las accesiones ingresadas a la colección.
Regeneración	A partir de una accesión que ha sido sometida a algún procedimiento de conservación, se obtienen nuevas muestras utilizando su capacidad de proliferación.
Caracterización o identificación	Identificación molecular para establecer el género y/o especie de aquellas cepas ingresadas a una colección de cultivos microbianos.
Documentación	Sistematización de datos. Realiza registros y análisis de la información asociada a las accesiones ingresadas a la colección en cualquier estatus.
Distribución	Entrega de copia de una accesión depositada en la colección a un solicitante determinado.

3.3.4. Definición de la política y objetivos de calidad

La política y objetivos de calidad son los pilares fundamentales del SGC y establecen las líneas de acción de la colección de cultivos microbianos en materia de gestión de calidad. Se trata de un documento escrito que, para el caso de la norma ISO 9001, se establecen dos condiciones para la Política de Calidad: (i) obliga a que debe estar documentada y descrita en un documento de consulta y de fácil acceso; (ii) debe ser impulsada desde las esferas directivas hacia el resto de la organización. Además, debe ser adecuada al propósito de la colección de cultivos microbianos en temas de calidad; debe recoger el compromiso de la mejora continua de los procesos; debe servir de referencia para la revisión y aplicación de los objetivos; debe ser un documento de fácil comprensión y acceso; debe actualizarse de manera permanente según los objetivos de calidad de la colección de cultivos microbianos y dar cumplimiento a los requisitos de las partes interesadas.

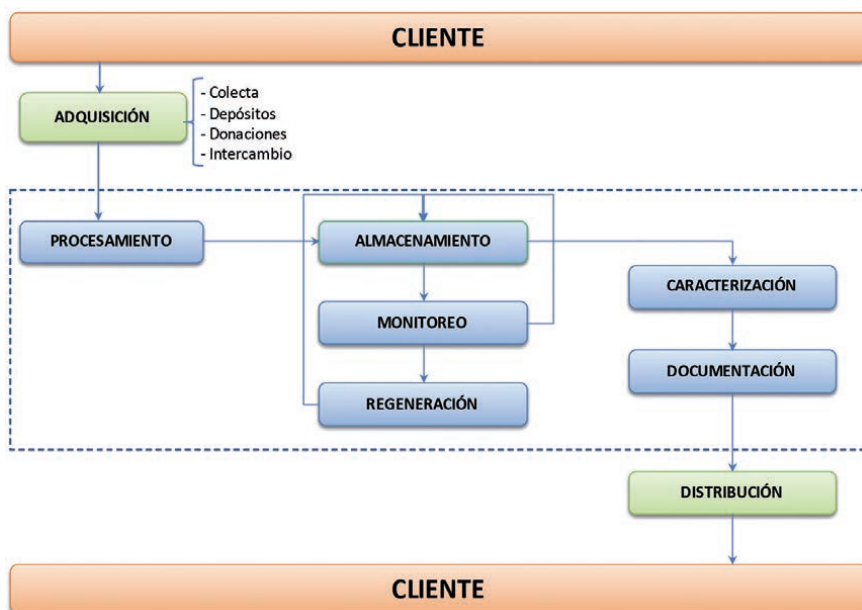


Figura 3.4. Procedimientos técnicos que componen el proceso de “Preservación”.

Los objetivos deben ser afines con las políticas de calidad, medibles, acertados para la conformidad de los productos y servicios, y para el aumento de la satisfacción del cliente, objeto de seguimiento y comunicados. Además, deben actualizarse en función de los cambios que ocurren en la organización.

3.3.5. Definición de la estructura documental

Los documentos deben ser definidos por la colección de cultivos microbianos y, en el caso de evaluar una certificación o acreditación por una norma, debe establecerse su jerarquía y un programa de revisión. Los documentos de un SGC consideran la Política y Objetivos de Calidad, el Manual de Calidad, procesos, procedimientos, instructivos y protocolos. En este aspecto, el Manual de Calidad es un documento relevante ya que contiene procedimientos documentados de la colección de cultivos microbianos en todos sus niveles y es un requisito para el caso de la norma ISO 9001:2015. El tamaño de este manual puede diferir, dependiendo de la organización, alcance, productos, complejidad de procesos y competencia del personal.

3.3.6. Capacitación

La capacitación en aspectos relacionados con el SGC en una colección de cultivos microbianos no es un tema fácil de abordar, ya que, en general, el personal que labora en ésta tiene un alto nivel de capacitación en aspectos técnicos relacionados con la preservación de microorganismos y es necesario cambiar la mentalidad del personal hacia un trabajo basado en normas y procesos controlados. Normalmente se van a encontrar personas que resisten el cambio, pero es necesario hacer un trabajo de concientización basado en la obtención de los beneficios colectivos y organizacionales.

3.4. Implementación del SGC

Es la etapa en donde se pone en marcha el SGC y el personal comienza a hacer uso de esta herramienta. Lo que antes se hacía de una manera, en esta etapa se deja de hacer como antes, y se comienza con la nueva forma de hacer las cosas. Dentro de la implementación del sistema se deben considerar las auditorías, las que deben ser periódicas. Las auditorías son revisiones del SGC que permiten conocer cómo está operando, observar las fallas para corregirlas y detectar oportunidades de mejora. Existen auditorías internas y externas. Estas últimas se realizan en el caso de que exista una certificación y/o acreditación de alguna norma nacional e internacional. La implementación también considera las revisiones generales del SGC que permita identificar fallas y sus acciones correctivas o preventivas dependiendo del caso. Es importante el involucramiento y compromiso de los directivos de la organización que implementa el SGC también llamados la "Alta Dirección", ya que ellos son claves en la toma de decisiones y en el aprovisionamiento de recursos para su implementación.

3.5. Verificación y seguimiento del SGC

Para verificar que el sistema se encuentre implementado y funcionando eficazmente, es necesario realizar un plan permanente de auditorías internas el que requiere ser ejecutado por personal capacitado y entrenado en la materia. En esta etapa se analizan los resultados obtenidos de las auditorías, además del seguimiento de las acciones correctivas implementadas y completadas. El seguimiento también permite determinar cómo se abordaron

las No Conformidades y si las oportunidades de mejora recomendadas permitieron aumentar la percepción de la calidad de los productos o servicios entregados.

3.6. Consideraciones finales

Para la implementación de un SGC se requiere del compromiso institucional, ya que implica una serie de acciones que requieren una inversión de tiempo y recursos. Dado lo anterior, el compromiso de la Alta Dirección es fundamental para el empoderamiento por parte de todo el personal de la organización, pensando en responder a las necesidades de sus clientes, con énfasis en la calidad del servicio. En el caso de las colecciones de cultivos microbianos, la combinación de aspectos técnicos, propios de la preservación de los microorganismos, con aspectos de gestión de calidad, permiten cumplir con el objetivo de garantizar la calidad de los materiales preservados en el largo plazo y de los servicios prestados.

La implementación de un SGC en una colección de cultivos microbianos, independiente que éste sea acreditado y/o certificado por una norma, permite planear, ejecutar y controlar las actividades necesarias para el desarrollo de la misión institucional, promoviendo el mejoramiento continuo de los procesos y aumentando el compromiso de los funcionarios con la institución. Esto se logra a través de una gestión con altos estándares de calidad, los cuales son medidos por indicadores de satisfacción de los clientes.

Como resultado, un SGC permite aumentar el grado de satisfacción de las actividades diarias, reflejado en una mejora del clima organizacional, institucional ante las partes interesadas y funcionarios. Así mismo, aumenta el grado de satisfacción de los clientes, permite optimizar la utilización de los recursos y tiempos de respuesta ante los requerimientos internos y externos, entre otros.

3.7. Literatura consultada

International Organization for Standardization (ISO). (2015). Norma internacional ISO 9001: Sistemas de gestión de calidad. Requisitos. ISO 9001:2015.

González, A. G., & Rodríguez, R. A. G. (2008). Diseño de un sistema de gestión de calidad con un enfoque de Ingeniería de la calidad. Ingeniería Industrial, 29(3), 1-6.

Martínez, M. (2001). Conservación de recursos genéticos. 04/11/2019, de Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF) Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Sitio web: http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_isaura_martin.pdf

Organización para la cooperación y el desarrollo y apoyo económico (OCDE). (2013). Lineamientos de la OCDE sobre buenas prácticas en biocustodia para CRBs. 04/11/2019, de Organización para la cooperación y el desarrollo y apoyo económico (OCDE) Sitio web: <https://www.oecd.org/sti/emerging-tech/OCDE%20Biocustodia%20en%20espa%C3%B1ol%20%202013.pdf>

World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. 06/11/2019, de World Federation for Culture Collections (WFCC) Sitio web: http://www.wfcc.info/pdf/Guidelines_e.pdf





4

**Colecta de
microorganismos**



Capítulo 4

Colecta de microorganismos

Lorena Barra Bucarei

Ingeniero Civil Industrial, Ingeniero Agrónomo, Mg., Dra.

INIA Quilamapu

4.1. Importancia de las colectas de microorganismos para la conformación de colecciones de cultivos microbianos

Los microorganismos son vitales para la vida en el planeta, dado que existe la certeza de que todos los organismos de la biósfera dependen de la actividad microbiana. Los microorganismos se pueden encontrar en diversos ambientes, tales como agua, suelo y aire. Son fundamentales para el ciclo continuo de los nutrientes y son productores de diversos compuestos utilizados en la síntesis de biocombustibles y en la producción de alimentos. Dado lo anterior, los microorganismos son claves para diversos programas de investigación y desarrollo, innovación tecnológica, procesos industriales y ambientales.

Muchos de los microorganismos no se pueden cultivar bajo condiciones de laboratorio, y los que se cultivan y se usan en laboratorios, deben estar disponibles en una colección de cultivos microbianos, para garantizar la reproducibilidad de los resultados de investigaciones. Una colección de cultivos se construye, en parte, gracias a las colectas que se realizan con objetivos específicos, estipulados en los programas de I+D+i o con el fin de resguardar la biodiversidad microbiana de una localidad o región determinada.

El propósito de este capítulo es entregar conocimientos y herramientas metodológicas para ser utilizadas como guías para quienes estén interesados en coleccionar material para el aislamiento de microorganismos de distintos sustratos, basado en el trabajo realizado por personal del Instituto de

Investigaciones Agropecuarias (INIA) por más de 20 años. Se revisarán aspectos desde el objetivo de la colecta, planificación, prospección, ejecución de la colecta y el procesamiento del material colectado (Figura 4.1.).



Figura 4.1. Esquema general de la planificación de una colecta de microorganismos.

4.2. Objetivo de la colecta

Al momento de planificar la colecta es fundamental tener claridad de por qué realizarla, para lo cual se sugiere el planteamiento de dos preguntas: ¿cuál es el objetivo de la colecta? y ¿cuáles son las características de los microorganismos que se pretende coleccionar? Hay que considerar que se pueden coleccionar microorganismos con un objetivo de investigación, por ejemplo, microorganismos extremófilos asociados a ciertos sustratos y condiciones ambientales. También se puede tener como objetivo la preservación de la diversidad microbiana de un territorio definido, el que puede estar siendo o no amenazado por factores abióticos y/o antrópicos. En ambos casos se debe definir el lugar en que se busca y las condiciones ambientales dónde buscar.

Junto con lo anterior, hay que tener claridad sobre el ambiente donde se coleccionarán los microorganismos ya que esto va a condicionar las metodologías y el instrumental necesario para realizar una campaña de colecta. Por ejemplo, si se pretende coleccionar microorganismos del aire se necesitan tener en cuenta que, normalmente, se requieren importantes cantidades de volumen de aire, debido a que la concentración de microorganismos en el aire es baja en comparación con el agua o el suelo. Se deberá disponer de contenedores y filtros para concentrar una biomasa microbiana que permita su posterior aislamiento.

4.3. Planificación de la colecta

Cada campaña de colecta debe ser minuciosamente planificada, ya que conlleva un sinnúmero de actividades que condicionarán los resultados esperados. Para una correcta planificación se recomienda considerar las características y condiciones del ambiente donde se realiza la colecta, el tipo de muestra a colectar (suelo, vegetal, aire, agua, etc.), los instrumentos y suministros requeridos, número de muestras a tomar y el tipo de procesamiento que deberá tener la muestra mientras llega a laboratorio.

Es importante planificar la época del año en la cual se realizará la colecta de microorganismos. En general, cualquier época es adecuada, sin embargo, se recomienda evitar estaciones húmedas y lluviosas debido a que el exceso de humedad podría promover el crecimiento de microorganismos que no son de interés para los objetivos previstos.

El monitoreo de las condiciones climáticas, y principalmente de la temperatura, es fundamental para establecer el tiempo de colecta. Por ejemplo, para climas fríos ($<20^{\circ}\text{C}$) se recomienda colectar por periodos de 4 a 5 días, mientras que en temporadas más cálidas ($>20^{\circ}\text{C}$) lo recomendado son 3 a 4 días, debido a que la temperatura puede afectar la calidad de las muestras y llevar la pérdida de microorganismos.

También es importante considerar que los sectores con mayor diversidad vegetal y de menos intervención antrópica, serán más ricos en microorganismos. Lugares poco intervenidos por la acción humana como, parques y reservas naturales, concentran una mayor diversidad microbiana y gran diversidad de especies vegetales. El acceso a estos lugares muchas veces se asocia a una solicitud de permiso para el ingreso y la toma de muestras, por lo que se recomienda elevar una solicitud con la debida anticipación para realizar la colecta en el momento oportuno. Para el caso de colectas en predios privados, se recomienda gestionar un documento de consentimiento informado previo, el cual es mencionado en el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) e indica que *“el acceso a los recursos genéticos estará sometido al consentimiento fundamentado previo de la Parte Contratante que proporciona los recursos...”* (CDB, Artículo 15; PNUMA, 1992). El consentimiento informado previo es un documento donde queda explícito el permiso por parte de los interesados para

que dé comienzo a la prospección biológica. INIA, a través de la Red de Bancos de Germoplasma, posee un documento tipo para estos efectos.

Es importante elaborar una propuesta de trabajo para la colecta que considere los posibles puntos de muestreo con una breve descripción de cada uno de ellos y tipo de muestra que se espera tomar. Una vez identificados los posibles puntos de muestreo, y previo a la colecta, se recomienda adquirir un mapa del terreno en papel o descargar una versión digital del mismo al teléfono móvil para acceder a él sin la necesidad de estar conectado a internet, ya que es posible que en el lugar de colecta haya recepción de señal de internet limitada o nula. También se deben revisar los antecedentes del terreno que se recorrerá, establecer los contactos y realizar las gestiones necesarias para la ejecución.

Se debe estimar la cantidad de material a traer de cada colecta, considerando el peso y volumen a trasladar, disponibilidad de personal y de material para el procesamiento posterior a la colecta y, en el caso de que la colecta esté asociada a la ejecución de un proyecto, considerar el objetivo o meta comprometido en el convenio y/o proyecto asociado.

Muchas veces se pasa por alto que, después de la colecta, se debe proceder al rápido procesamiento de las muestras. Hay una alta probabilidad de deterioro de las mismas en caso de no ser procesadas en el tiempo estipulado y se puede perder material genético. Por tanto, también se recomienda planificar cuidadosamente el procesamiento de las muestras.

4.4. Prospección

Cuando sea posible, se recomienda realizar una exploración al lugar donde se realizará la colecta. Esto permitirá hacer una correcta planificación para alcanzar los resultados esperados. La prospección también sirve para definir la logística de la campaña, además de tener la ubicación geográfica exacta y una posible ruta con puntos de muestreos.

4.5. Material recomendado para llevar a la colecta

Para la labor de colecta se necesitarán diversos materiales asociados a la toma de muestras como contenedores y herramientas, toma de datos y elementos de seguridad (Cuadro 4.1.).

Cuadro 4.1. Material básico necesario para la colecta de microorganismos.

Toma de muestra	Toma de datos	Seguridad
- Bolsas plásticas de cierre fácil. - Contenedores plásticos para líquidos (ej. tubos centrífuga). - Pala. - Rastrillo de mano. - Piolet. - Tijeras de podar. - Cortapluma. - Bolso o nevera para traslado de muestras y almacenamiento temporal. - Toalla de papel. - Guantes.	- GPS. - Block de notas. - Lápiz indeleble. - Etiquetas. - Cámara fotográfica digital. - Tarjeta de memoria. - Pilas y batería para cámara fotográfica. - Lupa. - Binoculares. - Brújula.	- Botiquín seguridad. - Vestimenta adecuada a las condiciones de terreno. - Bloqueador solar. - Alcohol gel. - Agua (y cantimplora). - Alimento. - Teléfono o radio. - Linterna de mano y frontal.

4.6. Ejecución de la colecta

En terreno es necesario que el líder del grupo pueda hacer una revisión de los materiales y de los elementos de seguridad que fueron establecidos en la planificación. Además, es necesario chequear que la vestimenta del personal sea la adecuada para las condiciones en las cuales se llevará acabo la colecta. El líder del grupo deberá realizar una charla de seguridad antes de partir el trabajo de terreno y establecer horas y puntos de encuentro en caso que el grupo decida dividirse para realizar la toma de muestra.

Cuando se tiene identificado el punto de muestreo, se recomienda hacer una breve descripción del lugar (por medio escrito, video o audio), marcar el punto con un GPS y tomar una fotografía en cada punto cardinal, previo a la toma de la muestra (Figura 4.2.), tomar la muestra según el tipo de material (Cuadro 4.2.),

rotular el envase con el código de la colecta y el número correlativo de la muestra, lugar, fecha y coordenadas geográficas. Se recomienda tomar una foto *in situ* de la muestra con la información del envase, lo que permitirá tener trazabilidad en caso que se pierdan los datos anexos que se toman. Además, se recomienda registrar las coordenadas en el GPS para ir elaborando una ruta que puede ser utilizada en el futuro con distintos fines, las muestras deberán ser trasladadas en un contenedor que les entregue las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y luz.

Para el caso de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos, las muestras colectadas son rotuladas con un código de tres letras, indicativas del lugar donde se colectan las mismas. Por ejemplo, si se colecta en la Isla Robinson Crusoe se utilizará el código "IRC_", seguido del número correlativo de la muestra, iniciando desde el número uno, "IRC_01".

Las muestras deben ser trasladadas a la brevedad al lugar de procesamiento o a un lugar transitorio que tenga las condiciones para evitar su deterioro. En el caso de utilizar un lugar de almacenamiento transitorio ordenar las muestras por tipo, en orden correlativo y registrar en una planilla (Foto 4.1).



Figura 4.2. Recomendación para la toma de fotografías de lugar de colecta.

Cuadro 4.2. Recomendaciones para la toma de muestras durante colectas realizadas por Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos del INIA.

Tipo de muestra	Recomendación
Suelo	Tomar suelo o sustrato según interés: de 5 a 10 cm de profundidad en suelos desprovistos de vegetación; 5 a 30 cm en el caso de suelo rizosférico; y en primeros 5 cm en suelos con capa vegetal. Mínimo 200 mL o 200 g y máximo en función del tipo de microorganismos que se esperan obtener y tipo de procesamiento.
Vegetal	Cortar partes representativas calculando la cantidad de material que se puede deteriorar producto de traslado y almacenamiento en terreno.
Agua	Utilizar envases estériles y tomar una alícuota representativa de las condiciones de interés (profundidad) y bajar su temperatura a 4 °C lo antes posible.
Insectos	Tomar de la manera más limpia posible y almacenar sin elementos contaminantes evitando el deterioro del insecto.



Foto 4.1. Principales actividades realizadas durante la ejecución de una colecta. (A) Identificación del lugar de colecta y toma de muestra; (B) toma de fotografía de la muestra colectada junto al lugar exacto de la toma de muestra; (C) registro de la ubicación geográfica de la muestra colectada mediante el uso de un GPS; (D) almacenamiento temporal de las muestras, previo a ser llevadas al laboratorio.

4.7. Entrega de material para procesamiento

Es necesario realizar una coordinación de la entrega de las muestras colectadas durante la campaña, sobre todo cuando el personal de colecta es distinto al que realizará el procesamiento. Se recomienda hacer una reunión de entrega. El material debe ser ordenado según el número correlativo de muestra y ubicado en un lugar amplio de tal forma que se pueda tener una visión general de todas las muestras y hacer una revisión para cerciorarse que no hubo pérdida de material. Posteriormente, dependiendo del tipo de muestra (suelo, material vegetal, aire o agua), debe ser entregada para su procesamiento. En el caso que una muestra sea utilizada con distintos fines, se recomienda comenzar con el procesamiento menos destructivo, es decir, aquel en que la muestra sea alterada lo menos posible.

4.8. Almacenamiento

En el caso de que las muestras no puedan ser procesadas de manera inmediata, se recomienda almacenarlas. Por lo general se deben considerar su almacenamiento a bajas temperaturas de 4 a 6 °C, en oscuridad y baja humedad relativa. Lo anterior va a depender de la muestra y de los microorganismos que se esperan obtener de ella. Por ejemplo, si se trabaja con organismos extremófilos, la muestra se deberá almacenar de acuerdo a las condiciones de temperaturas en que fue colectada, o si se trabaja con muestras colectadas en el desierto, se recomienda almacenarlas en un lugar de baja humedad relativa.

4.9. Registro de datos

La toma y registro de datos es fundamental para el trabajo posterior que se realizará con los microorganismos. En el caso de que los microorganismos aislados pasen a ser parte de una colección de cultivo, se deberá tener la información necesaria para completar el pasaporte de cada cepa. En el caso de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos, los datos requeridos para el pasaporte son:

- Nombre institución.
- Nombre colector.
- Código de colecta.

- Fecha de la colecta.
- Lugar de colecta.
- Coordenadas geográficas del lugar de colecta.
- Tipo de material colectado.

4.10. Literatura consultada

Park, H., & DuPonte, M. W. (2008). How to cultivate indigenous microorganisms. University of Hawaii. *Biotechnology*, BIO-9.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.

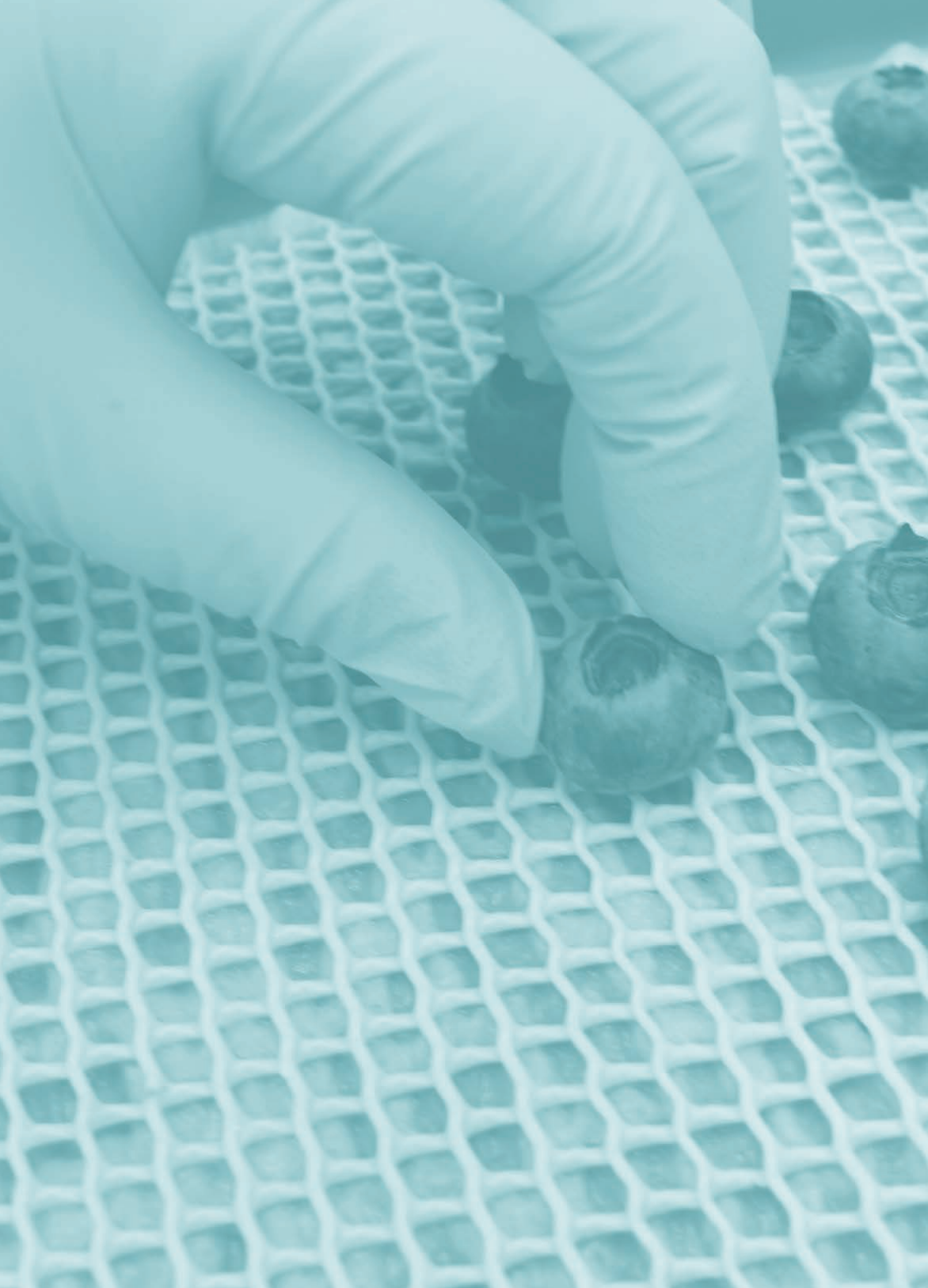
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, PNUMA (1992). "Convenio Sobre la Diversidad Biológica". Naciones Unidas.





5

**Aislamiento de
microorganismos
fitopatógenos**



Capítulo 5

Aislamiento de microorganismos fitopatógenos

Violeta Muñoz R.

Ingeniera agrónoma, INIA Quilamapu

Viviana Cisterna O.

Profesora de Biología y Ciencias Naturales, Mg., INIA Quilamapu

Andrés France I.

Ingeniero agrónomo, Ph.D., INIA Quilamapu

5.1. La importancia de mantener colecciones de microorganismos fitopatógenos

Las enfermedades en plantas constituyen una de las principales limitantes en los cultivos agrícolas, causando pérdidas de hasta un 20% de rendimientos a escala mundial y una pérdida adicional en la post cosecha del 10%. Los hongos y oomicetos fitopatógenos son el grupo más importante de agentes que causan enfermedades, teniendo repercusiones devastadoras en cultivos que marcaron hitos históricos, como la hambruna irlandesa a causa del Tizón de la papa en 1840, causada por el oomiceto *Phytophthora infestans*, y la hambruna de Bengala (India) de 1943 a causa del Tizón del arroz generado por el hongo *Cochliobolus miyabeanus* (*Helminthosporium oryzae*).

El aislamiento y la preservación de microorganismos fitopatógenos permiten disponer de material biológico para conocer sus características morfológicas, requerimientos o condiciones de crecimiento, estudiar sus mecanismos de patogenicidad, etc. La obtención de cultivos puros de microorganismos fitopatógenos es necesaria para la investigación e imprescindible para el desarrollo de estrategias de prevención y control de las enfermedades ocasionadas por éstos. No obstante, se estima que sólo un 0,001 a 10% de la diversidad total de microorganismos ambientales es cultivable; el otro 90% es

renuente a crecer con las técnicas de laboratorio tradicionales o, los medios de cultivos utilizados carecen de uno o varios componentes que permitirían el crecimiento de estos microorganismos.

Una planta u órgano enfermo actúa como reservorio de microorganismos y una fuente primaria de inóculo, permitiendo el aislamiento de microorganismos fitopatógenos desde ésta. El objetivo de este capítulo es describir las técnicas de colecta y aislamiento de microorganismos fitopatógenos establecidas en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y servir de referente para conectar las metodologías expuestas en los capítulos anteriores con las que se presentan en los siguientes capítulos. A través de las técnicas que se describen a continuación, se pretende guiar al lector sobre las consideraciones a tener en cuenta cuando se genera una colección microbiana de cultivos puros, para su posterior uso y/o preservación (Figura 5.1.).



Figura 5.1. Esquema general del proceso de aislamiento de microorganismos patógenos desde plantas.

5.2. Aislamiento de microorganismos fitopatógenos

El proceso de aislamiento se inicia con la colecta de plantas enfermas que son transportadas al laboratorio para su análisis. A partir de las muestras y mediante diferentes técnicas microbiológicas, se aíslan y se obtienen cultivos puros de fitopatógenos para su posterior preservación.

5.2.1. Colecta y transporte de las muestras

La colecta de muestras se inicia observando las plantas enfermas en terreno, elaborando una ficha con los antecedentes de la muestra (Cuadro 5.1.) y realizando la toma de fotografías de la muestra antes y después de retirarla del lugar. Debe establecerse una sigla para la colecta y enumerar las muestras de forma correlativa.

Cuadro 5.1. Información de pasaporte de la muestra colectada.

Ítem	Detalle
Fecha	Día, mes y año.
Lugar	Localidad, región, país; también registrar algún punto de referencia cercano.
Ubicación geográfica	Coordenada GPS: latitud y longitud, idealmente usar una notación para todos los registros, por ejemplo, grados (°), minutos (') y segundos (").
Huésped	Especie y variedad.
Edad del huésped	Fecha de siembra o plantación.
Tejido colectado	Rama, hoja, raíz, flor, fruto, etc.
Síntomas y signos	Síntomas: clorosis, necrosis, marchitez, presencia de tumores, anillado, cancros; signos: micelio, peritecios, esclerocios, etc.
Distribución del problema en el huerto	Plantas ubicadas en una sola hilera, plantas aleatorias dentro del huerto, plantas pertenecientes a un solo cuartel, etc.
Descripción del entorno	Utilización o tipo de <i>mulch</i> , presencia de restos de poda en el huerto, método de riego, etc.
Otra información de interés	Calendario de aplicaciones de fertilizantes y pesticidas, cultivo anterior.

Un aspecto fundamental es una buena descripción de la distribución de la enfermedad y los síntomas o signos presentes en las plantas. En fitopatología los síntomas se definen como la alteración o reacción interna o externa de la planta de carácter permanente producido por la enfermedad, y el signo se refiere a la presencia visible del patógeno o sus estructuras de crecimiento o reproductivas en la planta huésped (Foto 5.1.). Cuando se describen los síntomas, es necesario conocer si éstos se manifestaron de forma repentina o progresiva, dado que esta información podría ayudar al momento de realizar el diagnóstico para distinguir si son causados por un agente biótico (agentes vivos como plagas y microorganismos) o abiótico (agentes no infecciosos como factores ambientales que también causan enfermedades). Los síntomas provocados por un agente biótico se caracterizan por ser progresivos, en cambio los síntomas causados por agente abiótico aparecen de forma repentina y no presentan progresión de síntomas, como el daño de heladas o uso inadecuado de herbicidas.

Al momento de la toma de muestras se debe seleccionar material con diferentes estados o grados de desarrollo de la enfermedad, evitando seleccionar plantas con un estado avanzado de los síntomas o en proceso de descomposición, debido a que las plantas enfermas y con tejido muerto o necrótico son colonizadas por microorganismos saprófitos o patógenos secundarios, que dificultarán la aislación y obtención de un cultivo puro del patógeno.

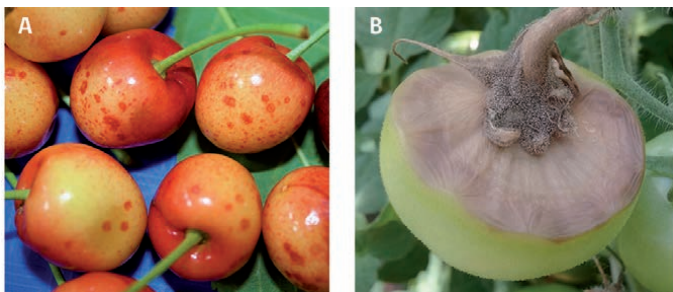


Foto 5.1. Diferencia entre el concepto de síntoma y signo. (A) Síntomas que se aprecian como manchas circulares en la epidermis de cerezas; (B) signo o estructuras del patógeno (micelio y cuerpos fructíferos) creciendo sobre tomate.

La distribución de los síntomas en la planta determina el tejido a colectar, ya que los síntomas podrían estar localizados en distintos tejidos de la planta como las raíces, el cuello o base del tallo, sólo en una rama (Foto 5.2.) o en los frutos y flores (Foto 5.3.). En caso de observar síntomas generalizados en la parte aérea de la planta, es necesario muestrear la planta completa incluyendo sus raíces y el suelo que está adherido, para evitar dañarlas. Los elementos de recolección como palas, tijeras de podar y bolsas deben estar limpios (no es necesario que estén estériles). Las plantas o tejidos colectados deben ser envueltos en papel húmedo, guardadas en una bolsa plástica para evitar la deshidratación, y transportadas en un ambiente fresco al laboratorio. Se recomienda transportar las muestras dentro de un recipiente que permita mantenerlas en frío.



Foto 5.2. Distribución de los síntomas en una planta de arándano. (A) Síntoma localizado sólo en una rama de la planta de arándano; (B) colecta de la rama afectada y presencia de tejido muerto en el interior de la madera.



Foto 5.3. Colecta de flores en plantas de arándano para evaluar incidencia de *Botrytis* sp.

5.2.2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Una vez en el laboratorio, las muestras deben inspeccionarse visualmente y describirse los síntomas y signos con el mayor detalle posible, indicando la zona de la planta donde se localizan. Para seleccionar los tejidos que serán procesados y donde se realizarán las técnicas de aislamiento, hay que tener en cuenta que los síntomas son una manifestación de la acción del patógeno en la planta y que no necesariamente el patógeno se encuentra en todos los tejidos donde se evidencian los síntomas. Un ejemplo de esto son las enfermedades causadas por especies del género *Phytophthora*, donde la planta puede tener una marchitez generalizada del follaje; sin embargo, el patógeno está colonizando las raíces y el cuello de la planta, destruyendo tejidos conductores que impiden la absorción de agua y nutrientes.

Con frecuencia, una planta puede ser atacada por más de un patógeno, los que pueden provocarle uno o varios síntomas de enfermedad. Como los síntomas son diversos, una forma sencilla de describirlos es separarlos en tres categorías: (i) síntomas hipertróficos o excesivo desarrollo de tejidos: como los tumores o agallas (Foto 5.4.), la proliferación de raíces o escoba de bruja, la floración excesiva, entre otros; (ii) síntomas atróficos que causan la disminución o falta de desarrollo de tejidos u órganos: entrenudos cortos, desarrollo inadecuado de las raíces, malformación de las hojas, falta de desarrollo en frutos y flores, y clorosis por producción inadecuada de clorofila y otros pigmentos que causan

tonalidad amarilla en las hojas (Foto 5.5.); (iii) necrosis o muerte de tejido: suelen ser los síntomas más notorios, especialmente cuando afectan a toda la planta, incluyen marchitamiento, lesiones necróticas que pueden causar perforaciones, pústulas y pudriciones (Foto 5.6.).



Foto 5.4. Excesivo desarrollo de células produciendo tumores o agallas en árbol de castaño.

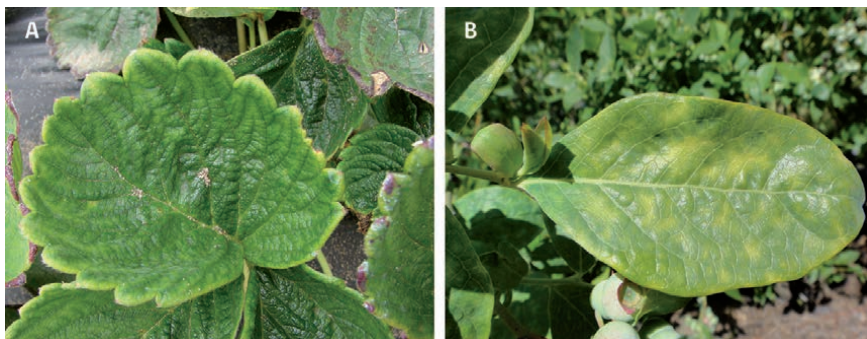


Foto 5.5. Inadecuada producción de clorofila o clorosis en hojas de (A) frutilla y (B) arándano.

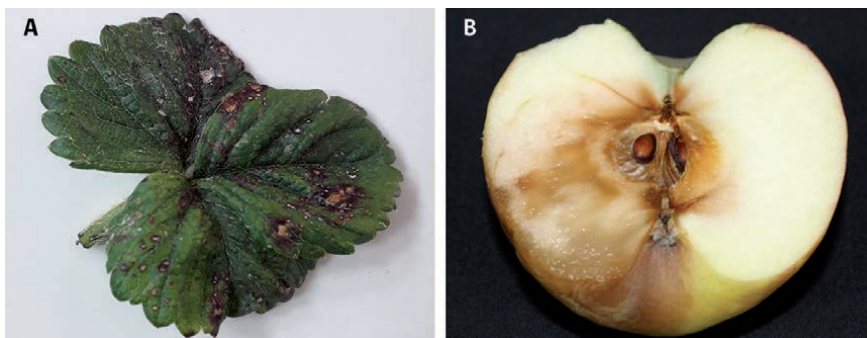


Foto 5.6. Tejido vegetal afectado por necrosis. (A) Pústulas causadas por el patógeno *Ramularia* sp. en hojas de frutilla; (B) necrosis o muerte de tejido en manzana causado por *Botrytis cinerea*.

Para describir estos signos y síntomas, la muestra se observa a simple vista y bajo la lupa estereoscópica, para el reconocimiento de signos como micelio, esporulación y cuerpos fructíferos (Foto 5.7.).



Foto 5.7. Presencia de cuerpos fructíferos (picnidios) del patógeno *Neofusicoccum* sp. en muestra de arándano observada con lupa estereoscópica.

5.2.3. Métodos de aislamiento de microorganismos

Luego de observar y describir los síntomas y signos, se determina el o los métodos de aislamiento más apropiados para aislar los microorganismos fitopatógenos. Las técnicas más utilizadas se describen a continuación.

5.2.3.1. Cultivo directo

Utilizando un estereomicroscopio, se revisa la muestra en búsqueda de signos del patógeno (Foto 5.8.). Utilizando una aguja estéril, se extraen estructuras de patógeno presentes en la muestra y se siembran, directamente, en medios de cultivo adecuados, los cuales pueden o no contener antibióticos para evitar crecimiento de microorganismos no deseados. Los medios de cultivos comúnmente utilizados para aislar bacterias son el agar nutriente (AN) y King B (KB). Este último se usa para el aislamiento, detección y diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. en base a la producción de fluoresceína, donde la interpretación de resultados se realiza examinando las colonias bajo la luz ultravioleta, a 260 nm; se considera un resultado positivo la observación de fluoresceína, que es un color amarillo-verdoso fluorescente que rodea la colonia o que se extiende por todo el medio de cultivo debido a fenómenos de difusión. Para hongos y oomicetos comúnmente se utiliza el agar papa dextrosa (APD) y agar agua (AA). Este último se usa para observar estructuras que sirven para la identificación de los microorganismos aislados (Cuadro 5.2.).



Foto 5.8. Aislamiento desde el cirrus producido por el patógeno *Gnomoniopsis castanea*, con ayuda de una aguja a partir de un fruto de castaño.

Cuadro 5.2. Medios de cultivos comúnmente usados para aislamiento de microorganismos (cantidades por 1 L de agua destilada).

Nombre medio de cultivo	Componente	Cantidad (unidad)
Agar papa dextrosa (APD)	Papa	200 g
	Agar	20 g
	Dextrosa	20 g
Agar nutriente (AN)	Extracto de carne de res	3 g
	Peptona	10 g
	Agar	20 g
Agar agua (AA)	Agar	20 g
King B (KB)	Digerido pancreático de caseína	10 g
	Peptona de proteosa	10 g
	Fosfato dipotásico	1,5 g
	Sulfato de magnesio	1,5 g
	Agar	15

5.2.3.2. Cámara húmeda

Esta técnica tiene por objetivo proporcionar las condiciones de temperatura y humedad que inducen el crecimiento y aparición de signos, de los microorganismos presentes en las muestras, permitiendo su aislamiento, caracterización y posterior preservación e identificación.

Se puede utilizar placas Petri, cajas plásticas o bandejas (Foto 5.9.A.) que deben ser desinfectadas utilizando alcohol 70%, colocar papel absorbente en la base y una malla plástica que evitará el contacto directo de las muestras con el papel. Luego el papel se humedece con agua destilada (no es necesario que el agua esté estéril) y se colocan las muestras distribuyéndolas sobre la malla para evitar el contacto entre ellas (Foto 5.9.B.). La bandeja se cubre con una bolsa plástica para formar un ambiente húmedo, pero favoreciendo el ingreso de aire para evitar generar un ambiente anaeróbico (sin oxígeno). Luego se incuban a 24 °C o a temperatura ambiente durante un máximo de 5 días o hasta el desarrollo de signos (Foto 5.9.C.). Se debe observar diariamente las muestras debido a que en la cámara húmeda también se propicia el crecimiento de microorganismos saprófitos, los cuales pueden impedir el aislamiento del patógeno debido a su rápido crecimiento y abundante producción de esporas que colonizarán rápidamente las muestras.



Foto 5.9. Método de aislamiento de microorganismos desde tejido vegetal usando cámara húmeda. (A) Materiales para preparar cámara húmeda; (B) flores de cerezo dispuestas en cámara húmeda; y (C) micelio y cuerpos fructíferos de *Cladosporium* sp. creciendo en el estigma de las flores de cerezo luego de incubación en cámara húmeda.

5.2.3.3. Siembra de tejido vegetal en medio de cultivo

Consiste en cortar pequeños trozos de tejido (3–5 mm) desde la zona de avance de los síntomas o lesión y sembrarlos en medios de cultivos (Foto 5.10). Para el aislamiento de patógenos que se encuentren bajo la epidermis de plantas enfermas o a partir de tejido muy contaminado, es necesario realizar una desinfección superficial del tejido antes de la siembra. Los métodos de desinfección superficial más utilizados son: (i) con una pinza tomar los trozos de tejido y pasarlos rápidamente por la llama del mechero y luego sembrarlos en medio de cultivo e incubar a 24°C; (ii) colocar los trozos de tejido en alcohol 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio 1% durante 1–3 minutos, alcohol 70% durante 30 segundos y realizar 3 lavados en agua destilada estéril durante 1 minuto. Secar los trozos en papel absorbente estéril y sembrarlos en medio de cultivo e incubar.



Foto 5.10. Siembra de trozos de tejido de la zona de avance de la lesión en medio de cultivo y crecimiento de micelio.

5.2.3.4. Cultivo de raíces en agua

Esta técnica se utiliza para el aislamiento principalmente de oomicetos y otros hongos del suelo que afectan las raíces y el cuello de las plantas, causando necrosis y desprendimiento del tejido cortical de las raíces. Se deben lavar bien las raíces con agua potable, procurando eliminar todo el suelo adherido a ellas. Luego se cortan segmentos de las raíces que presenten zona de avance de los síntomas y se colocan en una placa Petri, se cubren con agua destilada estéril y se incuban a temperatura ambiente (Foto 5.11.). Las placas deben ser revisadas bajo un estereomicroscopio, donde se observará el desarrollo de estructuras de los microorganismos.



Foto 5.11. Cultivo de raíces en agua.

5.2.4. Obtención de cultivos puros de los patógenos

Posterior al proceso de aislamiento es necesario identificar la presencia del patógeno en la placa, extraer sus estructuras y nuevamente sembrarlo en medios de cultivos hasta obtener el crecimiento de una colonia pura del patógeno en el medio de cultivo deseado. Estos cultivos puros se usan para identificar su afiliación taxonómica (género y especie), para su preservación a largo plazo o como fuente de inóculo para pruebas de patogenicidad.

Utilizando el microscopio, se deben identificar las estructuras del patógeno presentes en el medio de cultivo. Luego se deben seleccionar las colonias que se encuentren creciendo aisladas o más alejadas, tanto de la masa de micelio principal, como de las colonias de posibles contaminantes que puedan co-existir en la placa. En el caso de los hongos, se debe localizar el margen de crecimiento de la colonia. Luego, en el gabinete de bioseguridad o bajo la llama del mechero, se debe flamear una aguja, abrir ligeramente la placa para extraer un trozo de agar que contenga las estructuras (micelio) del hongo y sembrarlo en medio de cultivo. Cuando el patógeno produce cuerpos fructíferos o esporas, se puede intentar tomar estas estructuras desde la parte aérea de crecimiento y sembrarlas en una placa con medio de cultivo fresco.

En el caso de bacterias, el método más común para separar físicamente sus células, es la técnica de agotamiento por estría en medio de cultivo sólido (Foto 5.12.). Éste consiste en flamear un asa recta hasta que se torne roja, dejar enfriar entre 3 a 5 segundos y tomar una colonia individual. Luego, con el asa en un ángulo de 45° pasar a través de la superficie del medio con un movimiento en forma de "Z" a lo largo de la placa. Las placas se incuban a 30 °C durante 24 a 48 horas. Luego de la incubación se formarán colonias individuales visibles a simple vista o por microscopía, las que se pueden separar entre sí con un asa recta o aguja, dependiendo del tamaño de la colonia. Posteriormente se siembran de nuevo en una placa, para obtener un cultivo puro. El proceso se define por una etapa de separación (propagación de las células en una placa), una etapa de crecimiento (formación de las colonias), y una etapa de aislamiento (colonia por colonia).

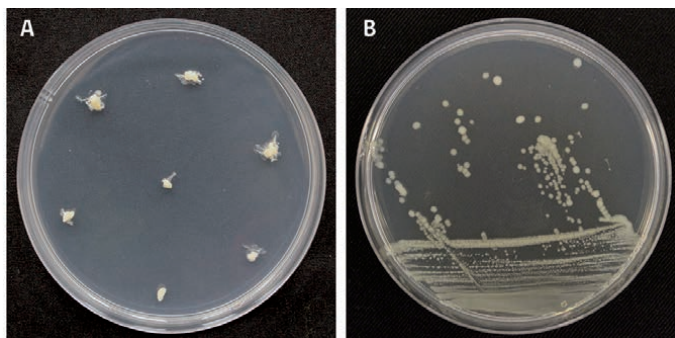


Foto 5.12. (A) Bacterias creciendo a partir de la siembra de tejido vegetal en medio de cultivo; (B) cultivo estriado de una colonia microbiana, donde se observa el crecimiento de colonias individuales.

Otra técnica para la recuperación de bacterias es la dilución hasta extinción, realizando diluciones seriadas a partir de la preparación de una solución con segmentos de la muestra y solución fisiológica estéril. La solución fisiológica estéril se prepara agregando 9,0 g por L de cloruro de sodio en agua destilada (la cual es posteriormente autoclavada a 121 °C por 15 minutos). También, para la recuperación de ciertas bacterias fitopatógenas, se utilizan medios de cultivo semi-selectivos o diferenciales, que permiten distinguir las colonias de las bacterias fitopatógenas de otras colonias de bacterias presentes en las muestras, como la utilización del medio KB para el aislamiento de bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas* (Cuadro 5.2.).

5.3. Identificación de los microorganismos patógenos

Luego de obtener cultivos microbianos puros, se debe identificar el microorganismo aislado, para distinguir si corresponde al patógeno o si es un saprófito. En el caso de hongos, se debe observar la morfología del micelio, cuerpos fructíferos y la forma de sus esporas o conidias, utilizando lupa estereoscópica y microscopio óptico. Observando lo anterior, los hongos se identifican mediante el uso de literatura o claves taxonómicas. Al identificar el género o la especie del hongo, se debe revisar si el microorganismo ha sido reportado como patógeno para el cultivo en estudio y si los síntomas observados en la planta coinciden con los provocados por éste. A su vez, se debe corroborar si el patógeno corresponde a una plaga cuarentenaria,

revisando los reportes oficiales del Servicio Agrícola Ganadero (SAG), organismo estatal a cargo del control oficial de estas enfermedades cuarentenarias y que tiene por objetivo controlar, suprimir o erradicar una plaga cuarentenaria que esté presente en alguna zona del país, así como proteger las áreas libres.

En el caso de bacterias, se observan las características macroscópicas de las colonias, por ejemplo, la morfología de la colonia y las reacciones que produce el microorganismo en el agar. También, observación microscópica con tinción de la colonia (agrupación, afinidad a tinciones y morfología del microorganismo). Si los síntomas que muestra la planta corresponden a los mencionados en la literatura, se puede determinar que el microorganismo aislado es el patógeno que causó la enfermedad, de lo contrario es necesario comprobar que el patógeno es capaz de causar síntomas y producir la enfermedad. Para ambos casos, una forma de comprobar que el organismo aislado corresponde al patógeno, se realizan los postulados de Koch, que consiste en utilizar un cultivo puro y, con una sola colonia, inocular una planta o las estructuras de un huésped aparentemente sano y susceptible para reproducir los síntomas de la enfermedad, y compararlos con los producidos por el patógeno. Finalmente, los patógenos pueden ser identificados, incluso a nivel de especie, mediante el uso de técnicas moleculares que se detallan en el capítulo 9.

5.4. Literatura consultada

Agrios, G.N. 2004. Plant Pathology. 5° ed. San Diego, California, Elsevier Academic Press. 922.

Bebber, D. P., Ramotowski, M. A., & Gurr, S. J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3(11), 985-988.

Bebber, D. P., & Gurr, S. J. (2015). Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62-64.

Strange, R. N. & P. R. Scott. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43, 83-116.





6

**Preservación de
microorganismos por
liofilización**



Capítulo 6

Preservación de microorganismos por liofilización

Cecilia Santelices S.

Técnico forestal, INIA Quilamapu

Jean Franco Castro F.

Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

6.1. Antecedentes históricos de la liofilización y la importancia de su uso

Un proceso rudimentario de liofilización tuvo su origen en el imperio Inca, alrededor del año 200 a.C., en la zona del altiplano andino a 4.000 msnm, el cual era utilizado para la fabricación del chuño (papa deshidratada) y charqui (carne de llama deshidratada); posteriormente, los vikingos utilizaron este proceso para la conservación de pescado.

El proceso de liofilización fue re-inventado en 1906 por Arsène d'Arsonval y Frédéric Bordas, mientras que en el año 1911 surgen los primeros métodos de liofilización para bacterias, empleando suero y leche como agentes protectores. La técnica de liofilización se desarrolla en forma industrial durante la Segunda Guerra Mundial y fue aplicada, fundamentalmente, a la liofilización de plasma humano y producción de penicilina.

La preservación de microorganismos es una tarea fundamental en una colección de cultivos microbianos. En ella se debe asegurar que la viabilidad y pureza de los microorganismos sea mantenida durante décadas. Para cumplir con este objetivo existen varias técnicas de preservación, siendo la liofilización un método que cumple con los requisitos exigidos por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC).

Uno de los principios básicos de la liofilización es la interrupción del crecimiento microbiano, donde prevalece la viabilidad y estabilidad genética del cultivo por un período prolongado. Este método proporciona una ventaja respecto a otras metodologías de preservación como la criopreservación, ya que no requiere de suministro eléctrico o de nitrógeno líquido constante.

En la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) se utiliza la liofilización como una de las técnicas para la preservación de microorganismos a largo plazo. Este proceso consta de cuatro grandes etapas: recepción de un cultivo microbiano, verificación de la pureza del cultivo, preservación del microorganismo por liofilización y evaluación de la viabilidad post-tratamiento de liofilización (Figura 6.1.). En este capítulo se abordarán temas teóricos y prácticos sobre la técnica de liofilización, aplicada a la preservación de microorganismos,



Figura 6.1. Esquema general del proceso de preservación de microorganismos por liofilización.

6.2. La técnica de liofilización y su aplicación para preservar microorganismos

La liofilización consiste en la eliminación del agua presente en una sustancia congelada, a través de la sublimación del hielo; es decir, el agua en estado sólido pasa a estado gaseoso directamente, sin pasar por estado líquido (Figura 6.2.).



Figura 6.2. Esquema de los estados del agua.

Para lograr la sublimación del agua congelada, la temperatura y la presión parcial del vapor de agua deben ser inferiores a la del punto triple del agua, es decir menor que 0,0099 °C y menor que 0,006 atm (610,5 Pa) y, cuando la muestra se calienta, el hielo se sublima directamente a vapor sin pasar por estado líquido (Figura 6.3.). El proceso físico de deshidratación producido en la liofilización puede afectar la estructura de las células, debido a la formación de cristales de hielo, tanto dentro como fuera de la célula, disminuyendo su viabilidad. El uso de sustancias protectoras de la liofilización (o lioprotectoras) para proteger a las células durante el proceso de liofilización es ampliamente utilizado en las colecciones de cultivos microbianos, por lo cual se recomienda su uso encarecidamente.

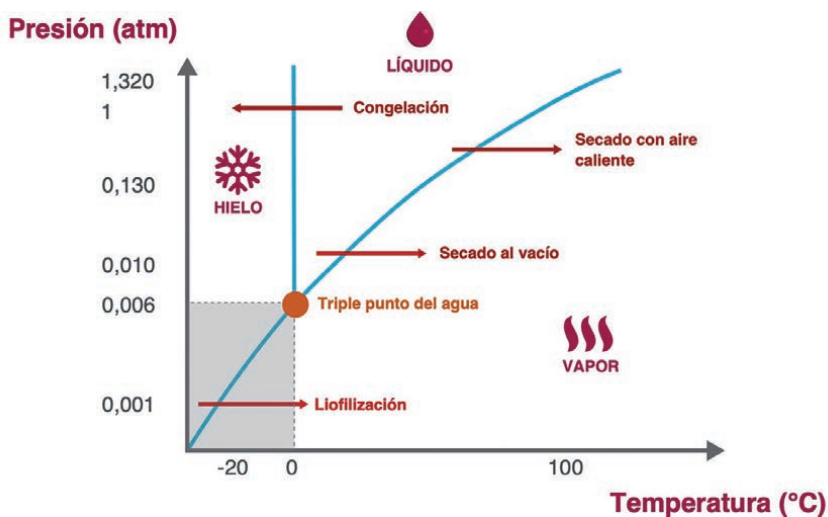


Figura 6.3. Diagrama de fases del agua en el que se grafica el fenómeno de la sublimación del hielo. El área gris es donde ocurre el fenómeno de sublimación. Fuente: adaptación desde Macassi & de Ugaz, 1995.

El proceso de liofilización tiene varias ventajas por sobre la criopreservación. Por ejemplo, tiene un bajo costo de mantenimiento debido a que los microorganismos liofilizados son preservados en viales o ampollas de vidrio, los que a su vez son almacenados en gavetas, prescindiendo de suministro de energía eléctrica para su mantención. Estos viales o ampollas de vidrio son de tamaño pequeño, por lo que son de fácil distribución, siendo el método ideal para el envío de muestras a terceros. Otra ventaja es que el microorganismo no

requiere ser cultivado previo al despacho, a diferencia de la criopreservación en que el material sí requiere ser cultivado antes de despacharlo.

En cuanto a las desventajas del proceso de liofilización, se puede mencionar que el equipo tiene un alto costo inicial y requiere personal capacitado para realizarlo, además de ser un proceso más lento y laborioso que la criopreservación. En general, la viabilidad de los microorganismos obtenida tras este proceso no es tan alta como en el caso de la criopreservación, además, hay microorganismos que no toleran el proceso de liofilización, como es el caso de aquellos pertenecientes a los géneros *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp., por lo que es necesario desarrollar nuevos protocolos para lograr este objetivo.

6.3. Equipamiento necesario para la liofilización

6.3.1. Liofilizador

La deshidratación de una muestra por sublimación se realiza en un liofilizador, equipo que puede tener múltiples configuraciones. El liofilizador de la Figura 6.4. corresponde a uno de bandejas, utilizado para liofilizar soluciones contenidas en viales de vidrio. Se compone de cuatro partes fundamentales: la primera es una cámara de secado, que por lo general se encuentra a temperatura ambiente, y es el lugar donde se produce la sublimación del solvente contenido en la muestra congelada, bajo condiciones de vacío. La segunda es un condensador, lugar donde ocurre la condensación del vapor del solvente sublimado en la cámara de secado, y corresponde a un recipiente de acero inoxidable que se comunica con la cámara de secado y que, dependiendo de las especificaciones del equipo, puede alcanzar una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. La tercera parte es un sensor de temperatura y presión que permite monitorear estos parámetros en tiempo real. La cuarta parte, y sólo en el caso de un liofilizador de bandejas, corresponde a una manivela ubicada en la parte superior del equipo y que está conectada a un tornillo sinfín. La manivela permite bajar las bandejas superiores y sellar los viales que se encuentran dentro del equipo (Figura 6.4.).

Un liofilizador posee un sistema de vacío, generado a través de una bomba de aceite que se encuentra anexa al equipo principal. La bomba de aceite está conectada a una trampa para evitar el paso del solvente desde el liofilizador hacia el interior de la bomba. La función de la bomba es, en primera instancia,

eliminar el aire del interior de la cámara de secado y luego generar el vacío suficiente para permitir la salida del vapor producido durante la sublimación (Figura 6.4.).

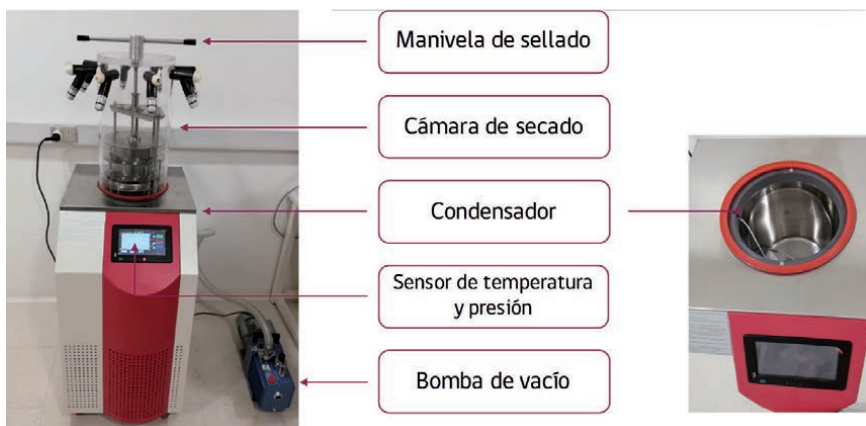


Figura 6.4. Equipo para la liofilización de cultivos microbianos y las secciones fundamentales que lo componen.

6.3.2. Insumos, accesorios y otros equipos requeridos

Para preservar microorganismos por medio de liofilización se requieren viales de vidrio de 2 mL, que necesitan de una tapa de goma para cerrarlos (Foto 6.1.A.). Posterior al proceso de liofilización, los viales son sellados con una tapa metálica (Foto 6.1.B.) para evitar la entrada de aire al material biológico contenido dentro del vial, lo cual se realiza con un alicate llamado crimpador manual de viales (Foto 6.1.C.). Las muestras requieren ser congeladas antes de introducirlas en el liofilizador, por lo que se requiere de un congelador que alcance temperaturas de -20°C (Foto 6.1.D.). Se recomienda utilizar para la rotulación de los tubos, etiquetas adhesivas con el número (o código) correspondiente u otra información relevante (Foto 6.1.E.).

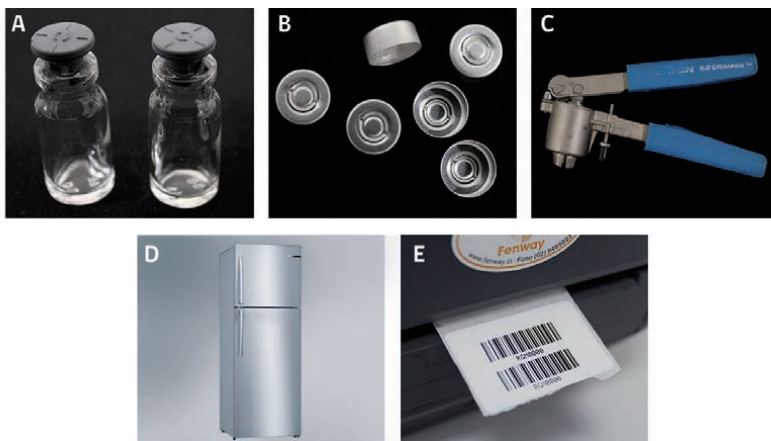


Foto 6.1. Insumos y equipos requeridos para el sistema de criopreservación. (A) Vial para liofilización y tapas de goma; (B) tapas metálicas; (C) alicate para sellar viales (crimpador manual para viales); (D) congelador o refrigerador con nevera; (E) etiqueta adhesiva.

6.3.3. Lugar para almacenar el material liofilizado

Para mantener cepas a largo plazo en viales de vidrio, es recomendable almacenarlos en gavetas o cajoneras que sean de un material resistente a golpes y fuego; por ejemplo, los ficheros de banco son muebles metálicos de seguridad que poseen cerraduras para restringir el acceso a su contenido y son resistentes a golpes. Este tipo de muebles son actualmente utilizados en la CChRGM para almacenar las muestras liofilizadas (Foto 6.2.).



Foto 6.2. Mueble de seguridad metálico para almacenar viales con material biológico liofilizado. Nótese que cada cajón está rotulado con números y letras para registrar la ubicación del vial.

6.4. Sustancias lioprotectoras

Los microorganismos, cuando son sometidos a procesos de congelación, pueden presentar pérdidas en la viabilidad de forma drástica. Para mitigar los efectos deletéreos del proceso de liofilización, se utilizan algunos compuestos químicos en solución para proteger el inóculo microbiano a preservar.

Algunos disacáridos como la trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa son utilizados como protectores en el proceso de liofilización. Del mismo modo, la leche descremada, suero de equino y diferentes polialcoholes, tales como glicerol, manitol, sorbitol, xilitol, han resultado ser eficaces como sustancias lioprotectoras. Se plantea la hipótesis de que los disacáridos pueden actuar reemplazando las moléculas de agua de la célula durante el proceso de liofilización, impidiendo la ruptura de su membrana. Sin embargo, en la literatura científica no hay un consenso respecto a los mecanismos de acción de los agentes lioprotectores.

Considerando que no existe una formulación de uso general para garantizar el éxito del proceso de liofilización en los diferentes géneros de microorganismos, la leche descremada es considerada un lioprotector ideal por su bajo costo y fácil adquisición. Contiene una mezcla de disacáridos y macromoléculas, como las lactoalbúminas y caseína, que protegen a las células durante este proceso. Para mejorar la sobrevivencia de los microorganismos, la solución de leche descremada puede ser suplementada con trehalosa o glutamato de sodio.

Existen algunos casos, en que los microorganismos son difíciles de preservar a través de liofilización usando sustratos líquidos. Para estos casos se recomienda el uso de soportes sólidos como, por ejemplo, semillas esterilizadas y tratadas con compuestos químicos para lograr la preservación de la cepa.

6.5. Etapas fundamentales del proceso de liofilización

A continuación, se procederá a describir los pasos más importantes del proceso de liofilización de una muestra de un cultivo microbiano, ya sea de hongos o bacterias. El proceso de liofilización comienza con la preparación de una mezcla compuesta por el inóculo del microorganismo y la sustancia lioprotectora disuelta en la solución. Luego, esta mezcla es congelada y posteriormente

transferida al equipo de liofilización. Dentro del equipo ocurre el secado de la muestra por sublimación del agua congelada y, cuando el proceso concluye, la muestra es sellada con el tapón de goma, al vacío (Figura 6.5.).

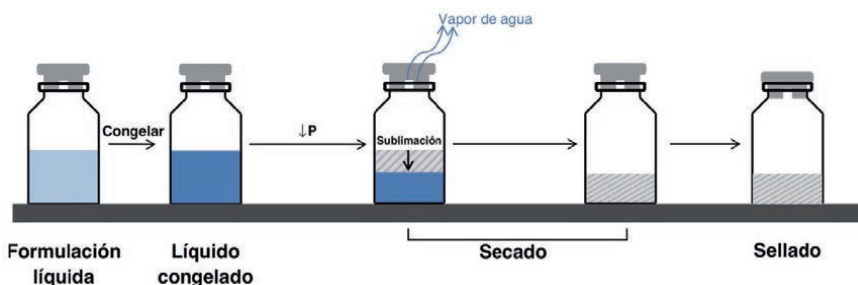


Figura 6.5. Principales etapas del proceso de liofilización de cultivos microbianos. Color azul claro representa solución en estado líquido que contiene el inóculo microbiano y la sustancia lioprotectora; color azul oscuro representa la misma solución anterior en estado sólido; ↓P, corresponde a una disminución de la presión dentro del liofilizador; zona gris achurada representa la muestra deshidratada. Fuente: adaptación de Chan et al., 2017.

6.5.1. Formulación de la muestra

La formulación de la muestra es fundamental para asegurar la sobrevivencia de las células durante la liofilización. En esta etapa se adicionan las células (o biomasa) a una solución a base de agua y una sustancia lioprotectora. Anteriormente se mencionó que algunos disacáridos y leche descremada actúan como sustancias lioprotectoras, formando una matriz que protege a la célula de los efectos dañinos sufridos durante el congelamiento y secado.

En los laboratorios de la CChRGM se han obtenido buenos resultados de viabilidad post-liofilización para microorganismos del género *Beauveria*, sólo empleando leche descremada al 10%, logrando porcentajes de germinación superiores al 90%. Para aislamientos del género *Trichoderma*, se ha mejorado la viabilidad post-liofilización adicionando trehalosa al 7% a la solución mencionada. Para el caso de bacterias, se han obtenido buenos resultados de viabilidad sólo empleando leche descremada al 10%. También se debe mencionar que en la CChRGM se utilizan formulados a base de soportes sólidos, como las semillas de mijo (*Pennisetum typhoides*) y otros aditivos (ver los protocolos detallados más adelante), los cuales han resultado ser eficaces para el caso de hongos que no forman esporas en medio de cultivo, por ejemplo, algunos basidiomicetes.

6.5.2. Congelación de la muestra

La congelación es una etapa esencial para obtener un producto final completamente deshidratado y de buena calidad. En este paso, la muestra ya formulada y dispensada en los viales de vidrio es congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la nevera del refrigerador, por aproximadamente 2 horas, hasta que la muestra esté completamente congelada. Notar que la tapa de goma está ligeramente sobrepuesta sobre el vial de vidrio, esto para permitir la salida del vapor de agua en el paso siguiente (Figura 6.5.).

6.5.3. Secado de la muestra

La sublimación del agua en una muestra congelada ocurre bajo condiciones especiales: la temperatura de la muestra debe ser menor que $0,0099\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la presión del sistema menor que $0,006\text{ atm}$ ($610,5\text{ Pa}$) (Figura 6.3.). Una vez congeladas las muestras, éstas son rápidamente transferidas al liofilizador, cuyo sistema de vacío es encendido hasta alcanzar la presión necesaria para estar bajo el punto triple del agua, donde ocurre la sublimación del solvente contenido en la muestra. Dependiendo del equipo, este proceso puede mantenerse por un período aproximado de 15 horas.

6.5.4. Sellado de la muestra

Los viales deben ser sellados una vez que la deshidratación de la muestra sea evidente, y se debe realizar mientras existan condiciones de vacío. Al retirar los viales, éstos son sellados con un sello metálico.

6.6. Procedimientos para la preservación de microorganismos por liofilización

Ya descritos los pasos más importantes dentro del proceso de liofilización, se procederá a detallar la metodología de liofilización utilizada en la CChRGM, la que consta de cinco etapas. Los materiales necesarios para liofilización son: leche descremada al 10% (lioprotector), cultivo microbiano, viales de vidrio de 2 mL y tapones de goma, pinzas, bisturí, sacabocado, micropipeta de $1000\text{ }\mu\text{L}$, puntas para micropipeta, asas de $10\text{ }\mu\text{L}$, placas Petri, etiquetas adhesivas, autoclave,

cámara de flujo laminar, sistema de congelación, liofilizador y mueble de seguridad para almacenar las muestras.

6.6.1. Etapa 1. Inspección primaria del cultivo microbiano

El proceso de liofilización se inicia con la recepción de un cultivo microbiano. Al llegar la muestra al laboratorio, ésta debe ser observada bajo lupa estereoscópica para determinar que el microorganismo se encuentre puro y sin crecimiento micelial o bacterial contaminante (distinto a las características propias del microorganismo a preservar) o que se detecte contaminación por artrópodos (Foto 6.3.A.). También se deben revisar las condiciones de embalaje de los cultivos recibidos, y no recibir muestras con sellado defectuoso, fisuras o rotura de las placas Petri o viales, etc. Cada muestra debe ser registrada con un número correlativo de ingreso y colocado en la muestra recibida en forma visible, por ejemplo, A 000 (Figura 6.3.B.).

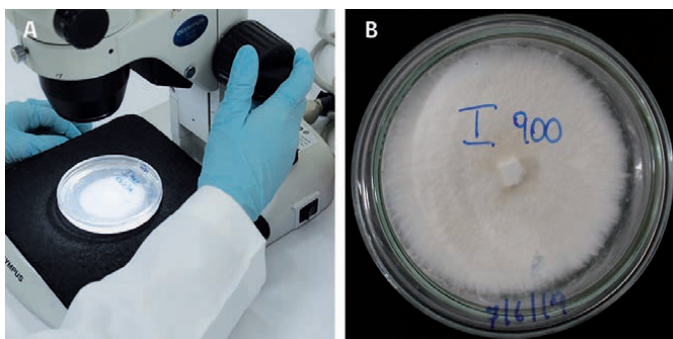


Foto 6.3. Verificación de pureza de un cultivo de hongo que será ingresado a una colección microbiana. (A) Revisión de pureza del cultivo; (B) asignación de número correlativo de ingreso de muestra.

6.6.2. Etapa 2. Procesamiento primario de la muestra

El procesamiento primario de la muestra se realiza bajo condiciones de esterilidad y consiste en realizar un subcultivo del microorganismo recibido en el paso anterior, sobre una placa Petri que contiene el medio de cultivo recomendado para el microorganismo. En el caso de hongos esporuladores y no

esporuladores, extraer con un asa de 10 μL una fracción del cultivo y depositar en el centro de una placa Petri con medio de cultivo (Foto 6.4.A.). En el caso de bacterias o levaduras, extraer con un asa de 10 μL desde una colonia aislada y realizar un rayado en una placa Petri con medio de cultivo (Foto 6.4.B.).

Luego de realizar la inoculación, el cultivo microbiano debe ser incubado hasta obtener un crecimiento evidente sobre la placa; en el caso de hongos, la temperatura de incubación va desde los 15 a 25 °C, aproximadamente. El tiempo va a depender de cada microorganismo. En el caso de las bacterias, la temperatura de incubación oscila entre los 28 a 38°C, y el tiempo de incubación va desde las 24 a 48 horas. Al finalizar esta etapa, se debe asegurar que el cultivo microbiano esté puro, para luego pasar a la preparación y formulación de la muestra para liofilización.

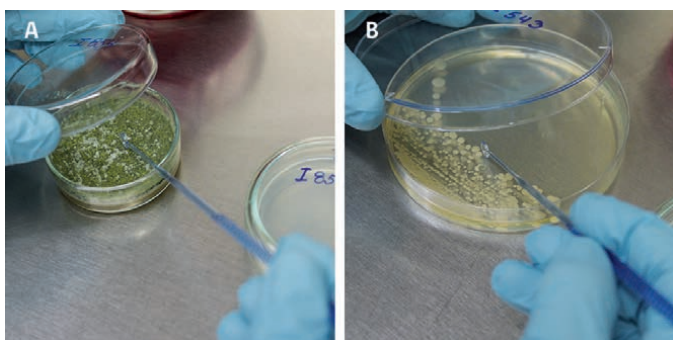


Foto 6.4. Procesamiento primario de muestra para evaluar la pureza del cultivo microbiano. (A) Para el caso de hongos esporuladores; (B) para el caso de bacterias y levaduras.

6.6.3. Etapa 3. Formulación de la muestra para la liofilización

Dependiendo de la estrategia para lograr una liofilización exitosa, se pueden usar dos protocolos para la formulación de las muestras. El primer protocolo es para bacterias y hongos esporuladores en formulación líquida, y el segundo es para basidomicetes en soporte sólido.

En este paso se deben preparar cuatro viales de vidrio, correspondientes a cuatro copias de seguridad, donde dos de estos viales serán destinados a las

pruebas de viabilidad (testigos) y las dos copias restantes serán almacenadas en gavetas, siempre y cuando se verifique que el microorganismo esté viable post-liofilización. Uno de los viales testigos se utilizará luego que transcurran 48 horas del término del proceso de liofilización, y el segundo vial se recomienda abrir después de 12 meses de almacenamiento, para verificar viabilidad. Un microorganismo se considera viable siempre y cuando pueda crecer sobre medio de cultivo después de 48 horas de terminado el proceso de liofilización.

6.6.3.1. Etapa 3.1. Formulaci3n líquida para bacterias y hongos

Este protocolo se inicia con un cultivo axénico (puro) y de abundante biomasa (Foto 6.5.). Los materiales utilizados, tales como tapones de goma, puntas de micropipetas y soluci3n de leche descremada al 10%, deben ser autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Los viales de vidrio son esterilizados en horno a 180 °C por 2 horas. Se debe considerar que no existe una formulaci3n general para la liofilizaci3n de microorganismos. Sin embargo, la soluci3n lioprotectora m3s utilizada en la CChRGM es la leche descremada al 10%, la cual puede o no incluir trehalosa al 7%.

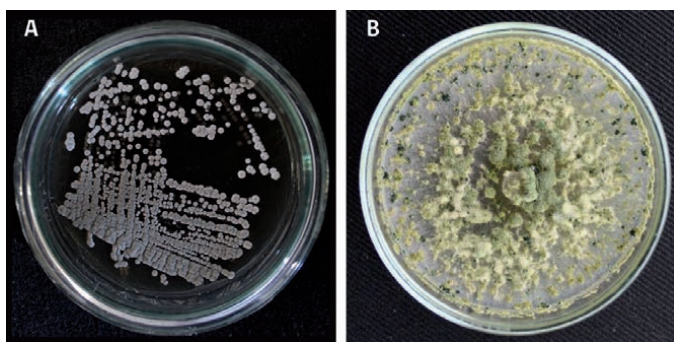


Foto 6.5. Cultivos axénicos de microorganismos utilizados para el proceso de liofilizaci3n. (A) Bacteria (*Streptomyces* sp.); (B) hongo (*Trichoderma* sp.).

La primera etapa de preparación de las muestras en formulación líquida se desarrolla bajo condiciones asépticas en un gabinete de bioseguridad. Se debe disponer de 4 réplicas en viales de vidrio debidamente rotulados con el número de ingreso del cultivo; cada vial es llenado con 0,4 mL de solución lioprotectora (Foto 6.6.A.). La solución lioprotectora es inoculada con biomasa de las placas de cultivo axénicos, donde las esporas o colonias microbianas son extraídas con asas de 10 µL y se depositan en los viales. Idealmente la solución debe contener sobre $1 \cdot 10^7$ UFC por mL. El contenido debe mezclarse muy bien hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, se sobrepone la tapa de goma en la boca del vial, sin cerrarlo, para permitir la evaporación del solvente que será eliminado en el proceso de liofilizado (Foto 6.6.B.).

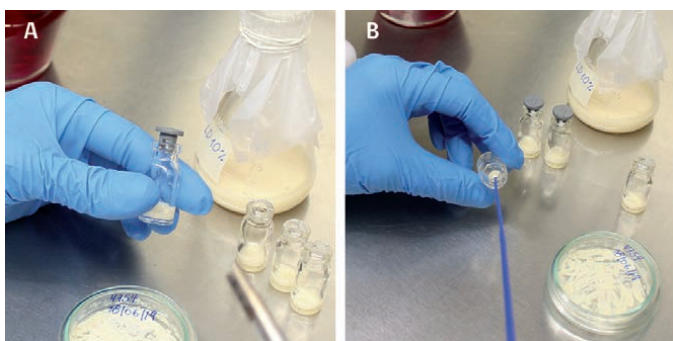


Foto 6.6. Realización de copias de seguridad de un cultivo microbiano. (A) Llenado de viales con solución lioprotectora estéril; (B) inoculación de la solución lioprotectora.

6.6.3.2. Etapa 3.2. Formulaci3n en soporte s3lido para basidiomicetes en semillas de mijo (*Pennisetum typhoides*)

Este protocolo ha sido validado en la CChRGM para los siguientes g3neros y especies microbianas: *Trametes* sp., *Stereum* sp., *Ganoderma* sp., *Chondrostereum purpureum* (Foto 6.7.), *Bjerkandera adusta* y *Schizophyllum commune*. Los materiales necesarios para llevar a cabo este proceso son semillas de mijo, carbonato de calcio, sulfato de calcio, tubos de ensayo de vidrio (50 mL), tap3n de gasa, viales para liofilizado, tapones de goma y algod3n hidr3fobo.



Foto 6.7. Cultivo axénico de un basidomicete (*Chondrostereum purpureum*) utilizado para el proceso de liofilización en soporte sólido.

Los materiales usados en este proceso, tales como, tapones de goma y puntas de micropipetas son autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Los viales de vidrio son esterilizados en horno a 180 °C por 2 horas. Las semillas de mijo se preparan de la siguiente forma: obtener una mezcla homogénea de semillas de mijo previamente lavadas, remojadas y drenadas con CaCO_3 (0,5%) y CaSO_3 (2%) a un pH cercano a 7,0. Introducir la mezcla en tubos de vidrio y llenarlos a un tercio de su capacidad. Colocar tapón de gasa y algodón hidrófobo (Foto 6.8.A.), autoclavar por 60 minutos a 121 °C dos veces consecutivas, con un intervalo de 24 horas. Una vez finalizado el proceso, transferir los tubos a cámara de flujo laminar hasta que el agua condensada de sus paredes se evapore completamente. Exponer durante 30 minutos a radiación UV bajo condiciones asépticas, por ejemplo, dentro de la cámara de flujo laminar (Foto 6.8.B.).

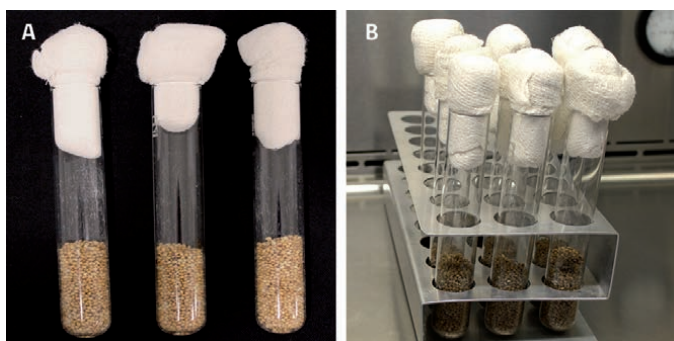


Foto 6.8. Procedimiento para la esterilización de semillas de mijo (*Pennisetum typhoides*) para liofilización de basidomicetes en soporte sólido. (A) Semillas de mijo tratadas, ocupando 1/3 del volumen de un tubo de ensayo; (B) semillas de mijo autoclavadas, siendo secadas en cámara de flujo laminar.

Los basidomicetos a preservar son crecidos en agar papa dextrosa e incubados a 25 °C durante 5 días (Foto 6.7.). Desde estas placas se extraerán discos de micelio para inocular tubos de ensayo con la mezcla de mijo. Se recomienda introducir los discos de micelio hasta el fondo del tubo para que la colonización del hongo sea más homogénea. Los tubos inoculados deben ser incubados durante 30 días a 25 °C, hasta que las semillas estén totalmente colonizadas (Foto 6.9.).

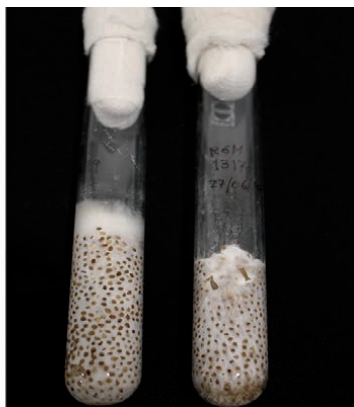


Foto 6.9. Semillas de mijo colonizadas por *Chondrostereum purpureum*.

Cada una de las 4 copias de seguridad son llenadas con, aproximadamente, 60 semillas inoculadas, alcanzando $\frac{1}{4}$ del volumen del vial de vidrio (Foto 6.10.).

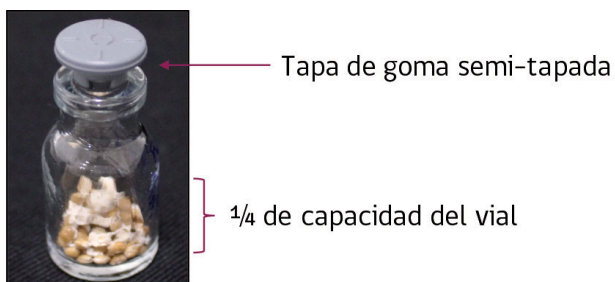


Foto 6.10. Llenado de vial con semillas para liofilización de microorganismos en soporte sólido.

6.6.4. Etapa 4. Precongelado y liofilización de las muestras

Posterior al proceso de llenado de los viales, ya sea usando el protocolo en formulación líquida o formulación en soporte sólido, éstos deben ser llevados al congelador del refrigerador, donde son mantenidos a -20°C durante 2 horas, aproximadamente, o hasta que la muestra esté completamente congelada (Foto 6.11.).

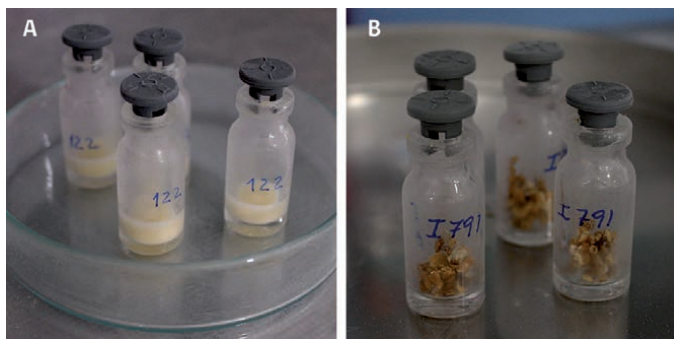


Foto 6.11. Viales en la etapa de precongelación, luego de pasar 2 horas a -20°C . (A) Muestras de hongos o bacterias en leche descremada al 10% en formulación líquida; (B) muestras de basidiomicetes colonizando semillas de mijo en sustrato sólido.

Posteriormente, las muestras son transferidas al liofilizador. Es importante mencionar que el liofilizador debe estar previamente encendido y asegurarse que la temperatura en el condensador sea inferior a -35°C (idealmente, cercana a los -50°C). Las muestras congeladas deben ser rápidamente puestas dentro del liofilizador para evitar que las muestras se descongelen. Luego de poner las muestras e instalar la cúpula, se debe encender la bomba de vacío (nunca encender la bomba antes de instalar la cúpula y asegurarse que todas las rosetas estén totalmente cerradas). Las muestras se liofilizan durante un período de 15 horas (toda la noche) (Foto 6.12.A.). Al día siguiente, los viales se cierran al vacío, utilizando manivela y se apaga el equipo (Foto 6.12.B.).



Foto 6.12. Muestras congeladas dentro del liofilizador. (A) Disposición de los viales en el interior del equipo; (B) sellado de los viales haciendo girar la manivela (imagen en el recuadro) mientras el equipo todavía está con vacío.

Los viales son retirados del liofilizador y para asegurar el sello de goma, éste es aprisionado contra el borde del vial mediante el uso de un sello metálico. Los viales son almacenados de forma provisional en un lugar fresco y oscuro por al menos 48 horas, para luego realizar la evaluación de viabilidad post-proceso de liofilización (Foto 6.13.).



Foto 6.13. Sellado del vial con tapa metálica, inmediatamente después de ser retirados del liofilizador.

6.6.5. Etapa 5. Evaluación de viabilidad de la muestra post-liofilización

Para la evaluación de la viabilidad post-liofilización, se deben recuperar los microorganismos desde un vial testigo, luego de 48 horas desde que el proceso de liofilización haya finalizado. En una colección microbiana, este paso es fundamental para el proceso de depósito de microorganismos, ya que, si el microorganismo tolera el proceso de preservación, entonces puede ser oficialmente depositado y registrado como parte de la colección, asignándole un número único de colección; de lo contrario, el microorganismo no es aceptado (Foto 6.14.). Para revisar los conceptos y metodologías del proceso de evaluación de la viabilidad microbiana, ver Capítulo 8.

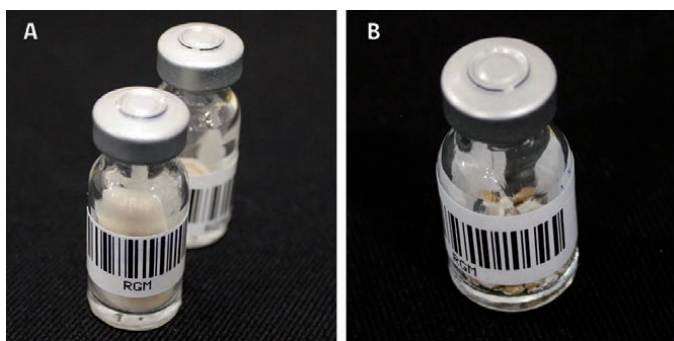


Foto 6.14. Viales con material biológico liofilizado etiquetado con número de colección único y código de barra. (A) Producto final a partir de formulación líquida; (B) producto final a partir de formulación en soporte sólido.

6.7. Almacenamiento del material liofilizado

Si los microorganismos toleran el proceso de liofilización, los viales son almacenados en gavetas metálicas resistentes, previamente individualizadas con el número de gaveta, número de cajón y, finalmente, la ubicación en cada compartimento de éste. En el caso de las gavetas usadas en la CChRGM (Figura 6.6.), cada gaveta posee 6 cajones, cada cajón está dividido en 6 compartimentos, cada uno con capacidad para 42 viales, siendo en total 252 puestos por cajón y 1.512 puestos por gaveta. Para la conformación de una colección microbiana, es importante calcular el número máximo de cepas que pueden ser almacenadas en el espacio disponible.

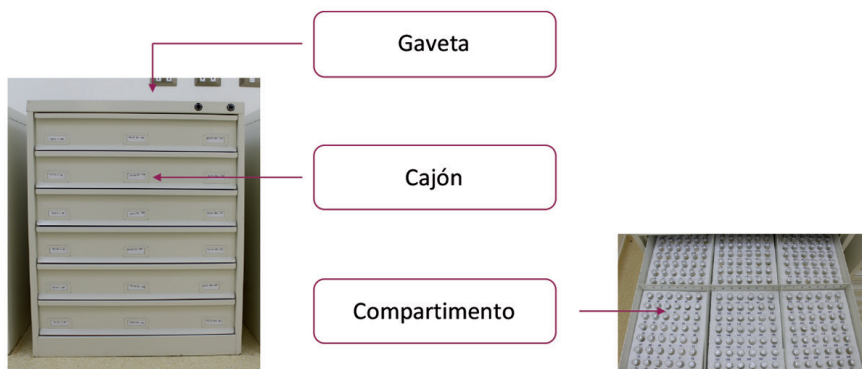


Figura 6.6. Gavetas para liofilizados y distribución interna de viales.

6.8. Regeneración de una muestra liofilizada para distribución

En la eventualidad de que algún microorganismo preservado en una colección de cultivos quiera ser utilizado, ya sea para realizar alguna distribución a un tercero o para realizar investigación dentro de las mismas instalaciones de la colección de cultivos, se necesita regenerar la muestra. Para esto, es necesario aplicar el procedimiento de regeneración de muestra que se describe en el capítulo 8.

6.9. Registros asociados al procedimiento de liofilización

Todo el proceso de liofilización debe ser registrado en un documento oficial, tanto en papel como en un sistema digital. En la CChRGM se registran los datos mencionados en el Cuadro 6.1., como parte del sistema de gestión de calidad.

Cuadro 6.1. Datos registrados durante el proceso de liofilización.

Registro	Dato a registrar
Ingreso de la cepa al laboratorio	Fecha y asignación de un número correlativo de ingreso. Ejemplo: A 000 (este número es distinto al número de colección asignado al final del proceso).
Viabilidad y pureza	Fecha y resultado: aprueba o rechaza.
Registro de cepa en la colección microbiana	Asignación de un número único de colección.
Ubicación en las gavetas	Número de gaveta, número de cajón y posición dentro cada compartimento.

6.10. Literatura consultada

Ávila, L. C., Naranjo, J. M., & Higueta, J. C. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10, 7-13.

Chan, M. Y., Dutil, T. S., & Kramer, R. M. (2017). Lyophilization of adjuvanted vaccines: methods for formulation of a thermostable freeze-dried product. In *Vaccine Adjuvants*, 215-226. Humana Press, New York, NY.

Day, J. G., & Stacey, G. (Eds.). (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, 368. Springer Science & Business Media.

Macassi, A. S., & de Ugaz, O. L. (1995). Liofilización. *Revista de Química*, 9(2), 173-183.

Ramírez-Navas, J.S. (2006). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*, 6(2).

Singh, S. K., Upadhyay, R. C., Yadav, M. C., & Tiwari, M. (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*, 87(5), 568-570.

Wessman, P., Håkansson, S., Leifer, K., & Rubino, S. (2013). Formulations for freeze-drying of bacteria and their influence on cell survival. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 78, e4058.

World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. 06/11/2019, de World Federation for Culture Collections (WFCC) Sitio web: http://www.wfcc.info/pdf/Guidelines_e.pdf

CAJA 10

CAJA 9

CAJA 8

CAJA 12





7

**Preservación de
microorganismos
por congelación**

CAJA 10

CAJA 9

CAJA 8

CAJA 12



Capítulo 7

Preservación de microorganismos por congelación

Yocelyn Ocares P.
Técnico agrícola, INIA Quilamapu

Jean Franco Castro F.
Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

7.1. Importancia de la preservación de microorganismos por congelación

Desde tiempos remotos, los microorganismos han sido utilizados para catalizar procesos orientados a la obtención de productos biotecnológicos y jugar un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales. El creciente interés en la protección de los recursos genéticos de un territorio e incentivar su uso para el desarrollo de innovaciones en biotecnología, han fortalecido la necesidad de preservar los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables en el tiempo. Un método utilizado para estos fines es la preservación por congelación o también conocida como criopreservación, la cual emplea temperaturas en el rango de -80 y -190 °C.

La criobiología es la disciplina que estudia la aplicación de bajas temperaturas para la preservación de material biológico y ha proveído las bases para la criopreservación como la conocemos hoy. El descubrimiento de las propiedades del glicerol como un protector criogénico a mediados del siglo XX revolucionó el desarrollo de esta técnica, la cual fue mejorando a través de la optimización empírica de un número de variables que afectan la sobrevivencia del material preservado. De esta forma, se han diseñado protocolos de criopreservación ampliamente utilizados en las colecciones microbianas, para evitar daños deletéreos en el material biológico, permitiendo mantener un cultivo microbiano a largo plazo.

El objetivo de este capítulo es entregar nociones teóricas y herramientas prácticas desarrolladas en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) sobre la implementación de la criopreservación en una colección de cultivos microbianos. Se describirán las cuatro grandes etapas del proceso, las que se inician con la recepción de un cultivo microbiano, en donde se verifica su pureza, para luego proceder a realizar la preservación del microorganismo por congelación y, posteriormente, evaluar la viabilidad post-tratamiento de congelación.



Figura 7.1. Esquema general del proceso de preservación de microorganismos por congelación.

7.2. La criopreservación como herramienta usada en una colección de cultivos microbianos

La preservación de microorganismos es parte importante de la labor de una colección de cultivos microbianos. A través de la preservación, se debe asegurar que la viabilidad y pureza de los microorganismos sea mantenida durante décadas. La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC) indica, en su manual para la operación y establecimiento de colecciones de cultivos, que la criopreservación es uno de los métodos que cumple con los requisitos para preservar cultivos microbianos a largo plazo, manteniendo la viabilidad y funcionalidad de los mismos.

La técnica de criopreservación consiste en congelar células o tejidos a temperaturas generalmente entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ultra-congelación) y $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido), reduciendo el metabolismo celular hasta el punto de prácticamente anularlo. Los microorganismos, antes de ser congelados, son suspendidos en un agente crioprotector, el cual ayuda a mejorar su supervivencia en comparación a si son suspendidos sólo en agua.

La criopreservación presenta ventajas sobre otros métodos de preservación, por ejemplo, se puede aplicar a la mayoría de los géneros microbianos, reduce

el riesgo de contaminación y permite la mantención de los microorganismos a largo plazo. Por otro lado, una de las desventajas de este sistema es que es dependiente de suministro de nitrógeno líquido o electricidad y requiere de la adquisición de equipos de alto costo, a diferencia del proceso de liofilización donde la mantención de los microorganismos es independiente de electricidad o nitrógeno líquido. Además, los continuos procesos de congelamiento y descongelamiento producen cambios en las células que pueden resultar letales para las mismas.

7.3. Equipamiento necesario para la criopreservación

7.3.1. Congeladores y tanques de almacenamiento

Para lograr preservar microorganismos por medio de criopreservación, una colección de cultivos microbianos debe disponer de equipamiento especializado. Los congeladores cumplen un rol importante para alcanzar temperaturas de preservación de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 7.2) y $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Foto 7.2.), mientras que para lograr temperaturas de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, se utilizan tanques especialmente diseñados para contener nitrógeno líquido (Foto 7.3.).

Un equipo congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Foto 7.1.) se utiliza, frecuentemente, en centros de investigación y universidades para preservar colecciones microbianas privadas o de trabajo que tengan una alta frecuencia de manipulación. Sin embargo, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no es una temperatura óptima para la preservación de microorganismos a largo plazo. El funcionamiento de este equipo depende del suministro eléctrico, y en la eventualidad de ocurrir el corte repentino de energía eléctrica, el tiempo aproximado que toma el descongelamiento del equipo es de 5 horas. Para este método se recomienda utilizar guantes criogénicos y mascarilla (Foto 7.4.).



Foto 7.1. Congelador de -80°C .

El equipo congelador de -150°C (Foto 7.2.) permite alcanzar una temperatura ideal para la preservación de microorganismos a largo plazo. Este tipo de equipo también depende del suministro eléctrico y es poco utilizado en los laboratorios donde se preservan microorganismos, debido a su alto costo. En la eventualidad de ocurrir un corte de energía eléctrica, el descongelamiento del equipo puede ocurrir entre un rango de 12 a 18 horas. Para este método se recomienda utilizar guantes para bajas temperaturas y protector facial (Foto 7.4.). El personal de la CChRGM que maneja estos equipos debe tener una capacitación previa sobre el manejo y los peligros asociados a la manipulación de implementos a bajas temperaturas.



Foto 7.2. Congelador de -150°C .

El sistema que utiliza nitrógeno líquido es el mejor método de preservación de microorganismos a largo plazo, ya que alcanza una temperatura de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sistema requiere de un tanque especialmente diseñado para transportar el nitrógeno desde el punto de producción (Foto 7.3.A.) y otro para recibir cargas de nitrógeno líquido y dónde se mantienen los microorganismos (Foto 7.3.B.). Estos tanques evitan la evaporación masiva del líquido y mantienen el interior aislado del ambiente para evitar aumentos bruscos de temperatura. A diferencia de los sistemas que son a base de congeladores, éste funciona de manera independiente de la electricidad; sin embargo, requiere de un suministro permanente de nitrógeno líquido, lo cual genera un alto costo de operación. Si el nitrógeno líquido no es producido en la colección de cultivo, su suministro está sujeto a la disponibilidad del insumo, al precio por metro cúbico y al precio de transporte.



Foto 7.3. Tanque para nitrógeno líquido. (A) Tanque de transporte de nitrógeno líquido; (B) tanque para nitrógeno líquido y almacenamiento de cajas.

Para usar este sistema se recomienda que el personal disponga de indumentaria especializada que garantice la seguridad de la persona y del entorno. Por ejemplo, se aconseja el uso de guantes criogénicos, protector facial y zapatos de seguridad adecuados (Foto 7.4.). Además, el personal de la colección que utiliza este sistema debe estar capacitado sobre el manejo y uso del nitrógeno líquido y, a diferencia del uso del sistema con congeladores, siempre se debe trabajar acompañado por un asistente quien también debe tener una capacitación formal sobre el uso del sistema.

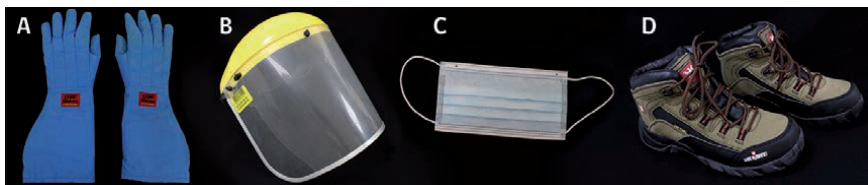


Foto 7.4. Implementos de seguridad utilizados para el manejo de equipos de criopreservación. (A) Guantes criogénicos; (B) mascarilla; (C) protector facial; (D) zapato de seguridad.

7.3.2. Insumos, dispositivos y accesorios requeridos para la criopreservación

Los microorganismos deben ser almacenados en contenedores especiales que resistan las bajas temperaturas. Para esto existen viales criogénicos que permiten contener el inóculo microbiano. Por lo general son tubos plásticos de polipropileno con faldón, tapa rosca y un anillo de goma que permite el cierre hermético entre la tapa y el resto del vial (Foto 7.5.A.). Estos viales deben ser almacenados en cajas de material resistente, que tenga numeración en la caja y en la tapa para conocer la ubicación de cada tubo, y que permita optimizar el espacio disponible en los congeladores (Foto 7.5.B.). Para que los tubos queden con un rótulo claro y duradero, se recomienda el uso de etiquetas de polipropileno autoadhesivas que permitan llevar impreso el número del microorganismo o alguna otra información; para llevar a cabo la impresión de la etiqueta, se requiere de una impresora especial que funcionan con cinta de transferencia térmica (Foto 7.5.C.).



Foto 7.5. Insumos requeridos para el sistema de criopreservación. (A) vial criogénico; (B) caja criogénica; (C) etiqueta adhesiva impresa en una impresora de transferencia térmica.

Para monitorear la temperatura del proceso de criopreservación se requiere de un dispositivo para adquirir datos de temperatura en tiempo real y saber si el equipo está funcionando de forma correcta o requiere alguna mantención o

reparación (Foto 7.6.A.). Otro dispositivo importante es el sistema Mr. Frosty^{TM 1} que permite realizar un descenso programado de temperatura de los viales criogénicos que contienen la solución criopreservante y el inóculo microbiano (Foto 7.6.B.), siendo un dispositivo vital para reducir los riesgos de dañar el material biológico a preservar. Un accesorio útil para mantener el orden en los congeladores son las gradillas, las cuales sirven para acomodar las cajas que contienen los viales criogénicos de forma ordenada (Foto 7.6.C.).

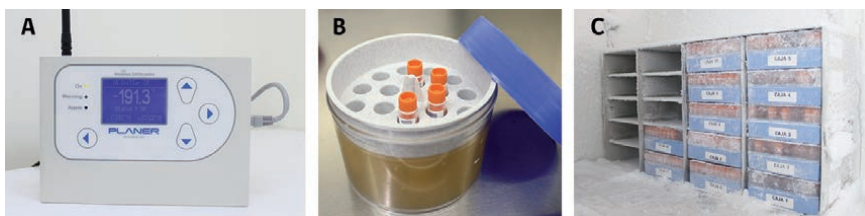


Foto 7.6. Dispositivos y accesorios requeridos para el sistema de criopreservación. (A) Termómetro de registro de datos para nitrógeno líquido; (B) Mr. Frosty^{TM 1}; (C) gradilla metálica para cajas criogénicas.

7.4. Sistemas de criopreservación

7.4.1. Crioprotectores

Los protectores criogénicos o crioprotectores son compuestos que protegen la célula microbiana durante el proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo. Existen varios compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores y para su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera preservar.

Los crioprotectores se pueden clasificar en dos: penetrantes y no-penetrantes. Los primeros son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular, por ejemplo, el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y el propanediol. Los segundos, son sustancias de alto peso molecular, las que son efectivas a velocidades altas de congelación, promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son la sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.

¹La mención de productos comerciales o empresas, no significan una recomendación INIA. Sólo se realiza a modo ilustrativo.

En la CChRGM, el crioprotector que se utiliza con mayor frecuencia es el glicerol a una concentración entre el 10 y 20%, el cual es esterilizado a 121 °C por 15 minutos. El dimetilsulfóxido (DMSO) también es utilizado a una concentración del 5%, se esteriliza por medio de filtración, pero su uso es poco frecuente.

7.4.2. Crioperlas

Es un sistema comercial de preservación de microorganismos. Consiste en un vial criogénico de 2 mL de polipropileno que contiene 25 crioperlas tratadas con crioprotectores que actúan como preservantes. Este medio protector que contiene las crioperlas está compuesto por triptona de soya, glicerol y sucrosa. Las crioperlas permiten obtener hasta 25 réplicas de una misma generación microbiana para utilizar progresivamente durante años; también facilitan la inoculación del medio bacteriológico, ya que cada perla equivale a un cultivo. Este método ayuda a prescindir de la descongelación de todo el vial cada vez que se extrae una perla, evitando la formación de cristales de hielo y minimizando el riesgo de contaminación cruzada (Foto 7.7.).



Foto 7.7. Sistema comercial de preservación de microorganismos a base de crioperlas y formulación crioprotectora.

7.5. Procedimiento para la preservación de microorganismos por congelación

En la CChRGM se preservan microorganismos por medio del sistema de criopreservación. Para este método existe un procedimiento establecido que se detalla a continuación, en seis etapas, tomando como ejemplo la recepción

de un cultivo microbiano cuya procedencia puede ser interna (dentro de la misma institución) o externa (de otra institución). Los materiales necesarios para criopreservación son: crioprotector (glicerol 10%), cultivo microbiano, vial criogénico de 2 mL, micro pipeta de 1000 μ L, asas de 10 μ L, sacabocado, placas Petri, Mr. Frosty™, alcohol isopropílico, sistema de congelación, autoclave y cámara de flujo laminar. La preparación de los materiales incluye autoclavar a 121 °C por 15 minutos los viales criogénicos conteniendo 1000 μ L la solución de glicerol al 10%; en el caso de DMSO al 5%, éste se debe esterilizar por filtración a través de un filtro de 0,22 μ m de material de nylon o politetrafluoroetileno (PTFE, teflón).

7.5.1. Etapa 1. Inspección primaria del cultivo microbiano

El proceso se inicia con la recepción del cultivo microbiano. Todo microorganismo debe ser revisado al momento de llegar al laboratorio, sin excepción. El cultivo se debe observar bajo lupa estereoscópica para determinar que la colonia microbiana esté pura, y que el crecimiento micelial o bacteriano coincida con las características descritas por la persona que realiza el depósito. Se debe rechazar cualquier cultivo que presente características diferentes a las propias de la especie a ser preservada o que se detecte contaminación de otros microorganismos o por artrópodos. También se debe revisar el estado en que son recibidos los cultivos. Si se trata de placas Petri, se debe revisar que éstas no estén quebradas o que el sello de las placas no haya sido alterado (Foto 7.8.A.). Siempre se debe asignar un número correlativo de ingreso a la muestra, para tener trazabilidad del proceso de depósito. Se recomienda usar una letra y números, por ejemplo, A 000 (Foto 7.8.B.).

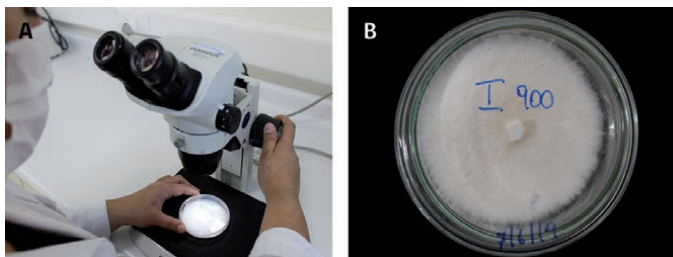


Foto 7.8. Verificación de pureza de un cultivo de hongo que será ingresado a una colección de cultivos microbianos. (A) Revisión de contaminación evidente en el cultivo; (B) asignación de número correlativo de ingreso de muestra.

7.5.2. Etapa 2. Procesamiento primario de la muestra

El procesamiento primario de muestra consiste en realizar un subcultivo del microorganismo recibido en el paso anterior, sobre un medio de cultivo recomendado para el microorganismo y bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de bioseguridad.

En el caso de hongos no esporuladores se debe tomar una fracción de la muestra con un sacabocado y colocar sobre medio de cultivo fresco con la ayuda de una aguja (Foto 7.9.A.). En el caso de hongos esporuladores, extraer con un asa de 10 μL esporas del cultivo y depositar en el centro de una placa Petri con medio de cultivo. En el caso de bacterias o levaduras extraer con un asa de 10 μL desde una colonia aislada y realizar un rayado en una placa Petri con medio de cultivo (Figura 7.9.B.). Luego de realizar la inoculación, el cultivo microbiano debe ser incubado hasta obtener un crecimiento evidente sobre la placa; en el caso de hongos, la temperatura de incubación va desde los 15 y 25 °C, aproximadamente, y el tiempo va a depender de cada microorganismo. En el caso de las bacterias, la temperatura de incubación oscila entre los 28 y los 38 °C, mientras que el tiempo de incubación va desde las 24 a 48 horas. El cultivo microbiano puede ser utilizado en el paso siguiente, siempre y cuando se verifique pureza del mismo.

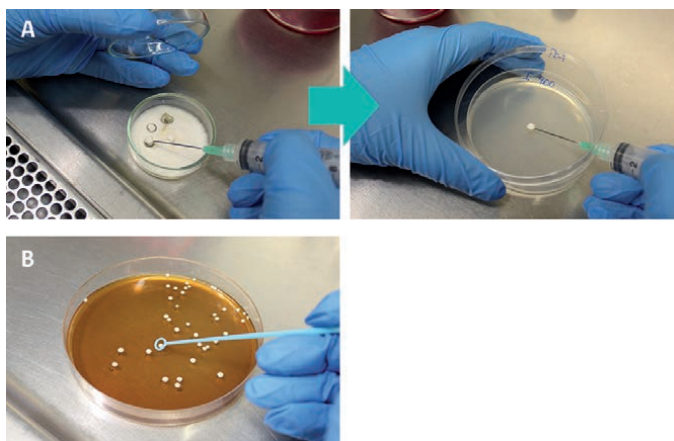


Foto 7.9. Evaluación de pureza del cultivo microbiano a través de un subcultivo del microorganismo en medio de cultivo fresco. (A) Para caso de hongos no esporuladores; (B) para el caso de bacterias y levaduras.

7.5.3. Etapa 3. Realización de copias de seguridad del cultivo microbiano

El cultivo microbiano, obtenido a partir del subcultivo, será utilizado para realizar las copias de seguridad que serán almacenadas a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido. Se deben preparar cuatro viales criogénicos, correspondientes a cuatro copias de seguridad, donde uno de estos viales será destinado a la prueba de viabilidad (testigo) y las tres copias restantes serán permanentemente almacenadas en el sistema de frío, siempre y cuando se verifique que el cultivo tolera el proceso de preservación.

Transcurridas 48 horas de la preservación, se debe retirar una de las copias testigo desde el sistema de frío, la cual será utilizada para verificar si el microorganismo representa un cultivo puro y viable post-tratamiento de preservación. Si el resultado es positivo, es decir, el microorganismo toleró el proceso de preservación, se recomienda almacenar una copia en congelador de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dos copias en nitrógeno líquido (Foto 7.10.).



Foto 7.10. Copias de seguridad de un cultivo microbiano.

La manera de realizar las copias de seguridad dependerá del tipo de microorganismo. Por ejemplo, para el caso de un hongo no esporulador, el procedimiento consiste en retirar un trozo de agar mediante el uso de un sacabocado previamente esterilizado a la llama del mechero. Este trozo de agar debe llevar micelio del hongo y luego se debe depositar dentro del vial criogénico, previamente llenado con $1000\text{ }\mu\text{L}$ de glicerol al 10% (estéril) (Foto 7.11.A.).

Para el caso de un hongo esporulador, se deben extraer esporas desde la superficie del cultivo, utilizando un asa de 10 μL y depositar en un vial criogénico, previamente llenado con 1000 μL de glicerol al 10% (estéril) (Figura 7.11.B.). Para el caso de levaduras o bacterias, utilizar un asa de 10 μL para retirar una colonia aislada desde la placa y depositar en un vial criogénico con 1000 μL de glicerol al 10% (estéril) en su interior (Figura 7.11.C.). Por supuesto, dependiendo del género microbiano, se pueden utilizar diferentes soluciones crioprotectoras y diferentes volúmenes dentro del vial.

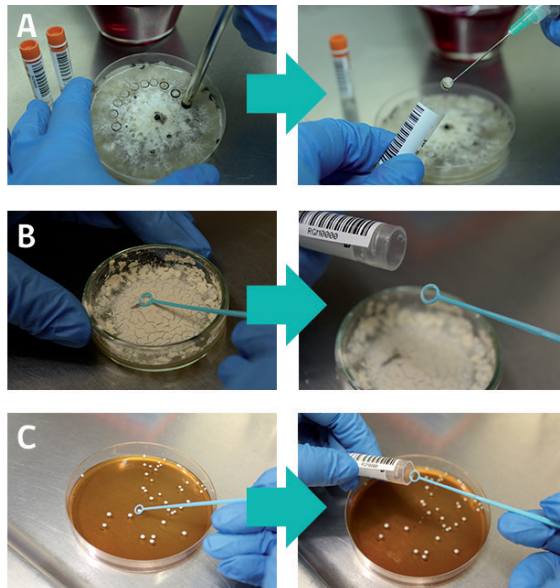


Foto 7.11. Procedimiento para realizar copias de seguridad de microorganismos para ser preservados por criopreservación. (A) Metodología para caso de hongos no esporuladores; (B) para el caso de hongos esporuladores; (C) para el caso de bacterias o levaduras.

Desde el punto de vista práctico, se recomienda que previo a la congelación del cultivo microbiano se asigne un número de colección temporal, el cual debe ser impreso en una etiqueta y pegado sobre el tubo. Esto se recomienda debido a que cuando el vial criogénico se congela con la muestra microbiana, éste se escarcha y no permite que la etiqueta se adhiera de forma efectiva a él después de ser congelado. Si se verifica que el cultivo microbiano representa un cultivo puro y viable post-tratamiento de criopreservación, entonces el número asignado como temporal pasa a ser permanente; si ocurre lo contrario,

el cultivo se elimina y el número de colección queda disponible para ser reasignado al siguiente cultivo.

7.5.4. Etapa 4. Descenso programado de temperatura

Una vez realizadas las copias de seguridad, los viales criogénicos se deben depositar en el sistema Mr. Frosty™, el cual es previamente llenado con alcohol isopropílico. Este sistema permite realizar un descenso programado de temperatura en su interior de 1 °C por minuto. El contenedor actúa como un baño para lograr una transferencia de calor y congelación de manera uniforme. Para poder lograr un descenso programado óptimo, el dispositivo debe tener una temperatura inicial de 4 °C, por lo que se recomienda que luego del llenado con alcohol isopropílico, éste sea dejado en el refrigerador por al menos 2 horas. Luego, el contenedor es llenado con los viales criogénicos y llevado al congelador a -80 °C por un período de 4 horas (Foto 7.12.).

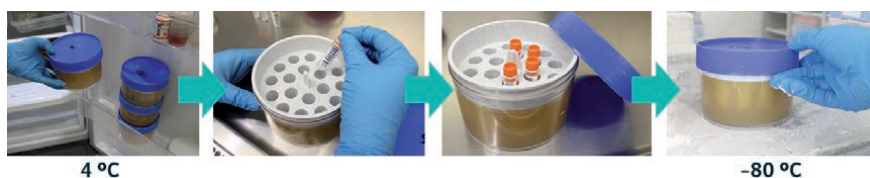


Foto 7.12. Procedimiento para realizar el descenso programado de temperatura de las copias de seguridad del cultivo microbiano.

7.5.5. Etapa 5. Almacenamiento en congelador

Transcurridas las 4 horas desde que los viales criogénicos fueron dejados en el sistema Mr. Frosty™ a -80 °C, éstos son sacados del congelador y ubicados en la caja criogénica correspondiente, la que posteriormente es dejada en el congelador a -150 °C (Foto 7.13.).



Foto 7.13. Procedimiento para almacenar las cepas en congelador a -150 °C.

7.5.6. Etapa 6. Evaluación de viabilidad de la muestra post-criopreservación

Para la evaluación de la viabilidad post-criopreservación, se deben recuperar los microorganismos desde el sistema de refrigeración, 48 horas posterior al proceso de criopreservación. Este paso es fundamental para el proceso de depósito de microorganismos en una colección de cultivos, ya que, si el microorganismo tolera el proceso de preservación, puede ser oficialmente depositado y registrado como parte de la colección, otorgándole un número definitivo de colección. De lo contrario, el microorganismo no es aceptado y el número de colección será asignado a otra muestra. Los conceptos y la metodología usada en el proceso de evaluación de la viabilidad microbiana se detallan en el capítulo 8.

7.6. Almacenamiento del material criopreservado

Si los microorganismos toleran el proceso de criopreservación, los viales criogénicos son almacenados en cajas criogénicas organizadas dentro de gradillas metálicas, las que a su vez son introducidas en el congelador o tanque de nitrógeno líquido. Cada caja tendrá rótulos escritos en sus cuatro costados, al igual que cada gradilla, con el objetivo de guiar al personal en la búsqueda de un microorganismo (Figura 7.2.).

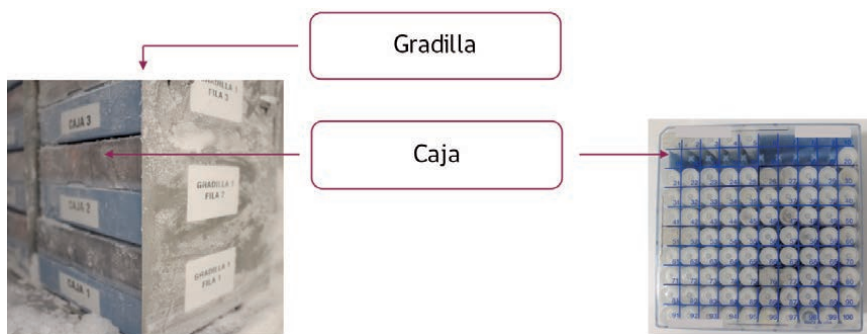


Figura 7.2. Gradillas para organizar cajas criogénicas, conteniendo viales criogénicos con los microorganismos criopreservados. Notar la numeración de la gradilla y cajas.

7.7. Regeneración de una muestra criopreservada para distribución

En la eventualidad de que algún microorganismo preservado en una colección de cultivos quiera ser utilizado, ya sea para realizar alguna distribución a un tercero o para realizar investigación, se necesita regenerar la muestra, para lo cual es necesario aplicar el procedimiento descrito en el capítulo 8. El microorganismo debe ser sembrado en duplicado e incubado a la temperatura correspondiente. Una placa es utilizada para la distribución y la segunda para la reposición del cultivo microbiano retirado del congelador.

7.8. Registros asociados al procedimiento de criopreservación

Todo el proceso de criopreservación debe ser registrado en un documento oficial, tanto en papel como en un sistema digital. En la CChRGM se registran los datos mencionados en el Cuadro 7.1., como parte del sistema de gestión de calidad.

Cuadro 7.1. Datos registrados durante el proceso de criopreservación.

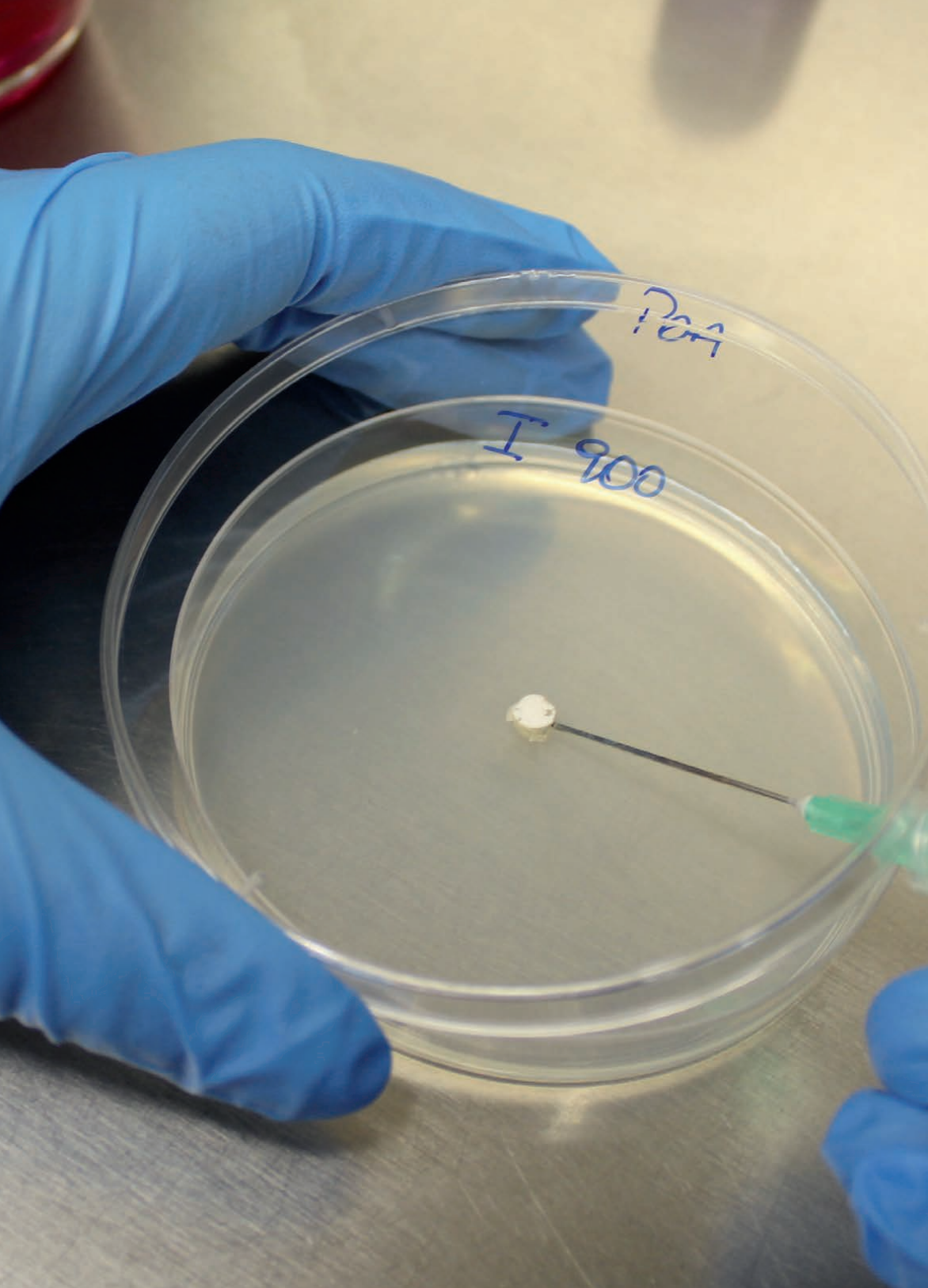
Registro	Dato a registrar
Ingreso de la cepa al laboratorio	Fecha y asignación de un número correlativo de ingreso, ejemplo A 000 (este número es distinto al número de colección asignado al final del proceso).
Viabilidad y pureza	Fecha y resultado: aprueba o rechaza.
Registro de cepa en la colección microbiana	Asignación de un número único de colección.
Ubicación en los sistemas de frío	Número de gradilla, número de caja y posición dentro de la caja.

7.9. Literatura consultada

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M. & Reguero, M. T. (2006). Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.

Pegg, D. E. (2002). The history and principles of cryopreservation. In *Seminars in reproductive medicine*, 20(1), 5-14. Thieme Medical Publishers, Inc., New York, USA.

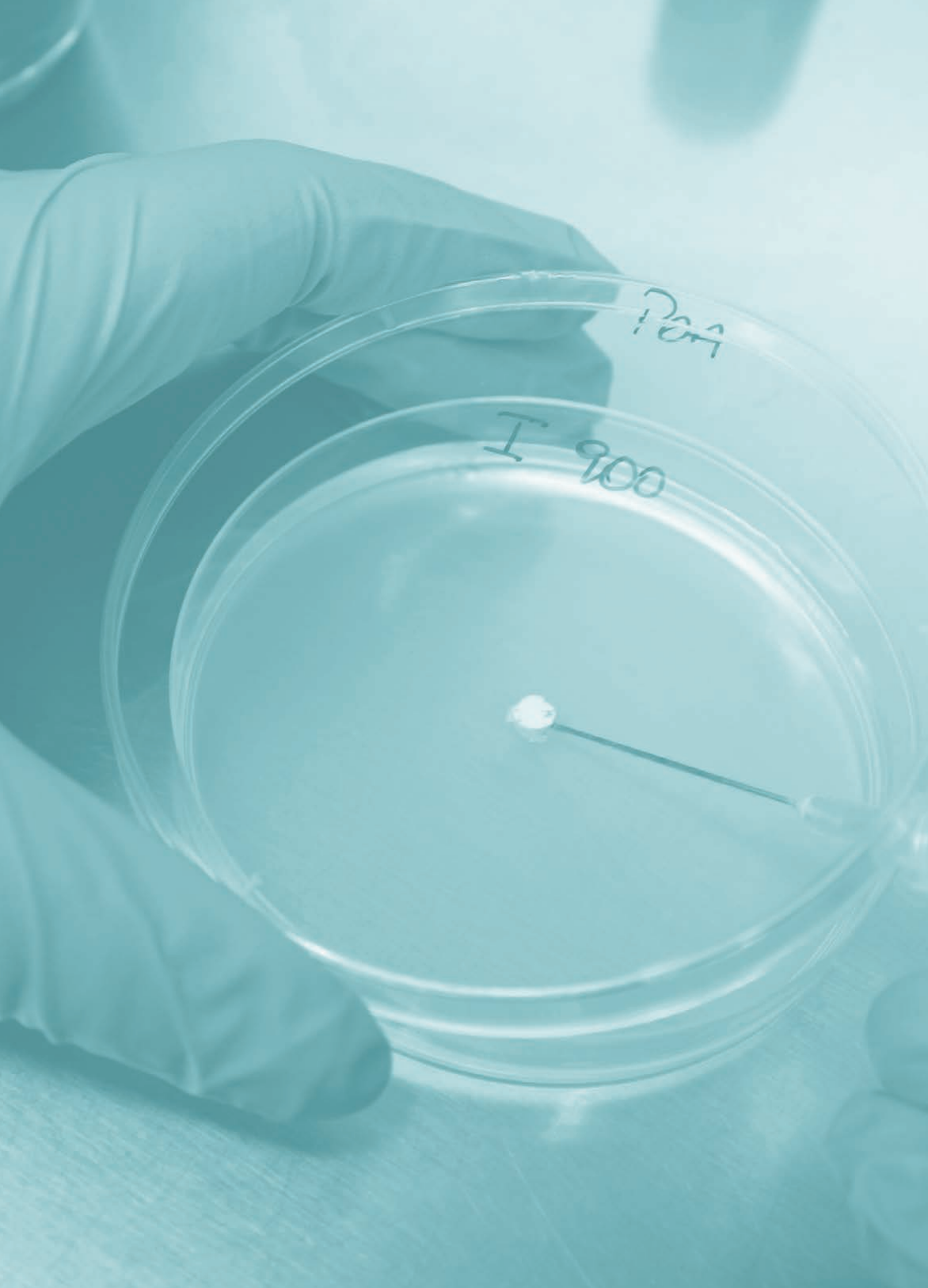
World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. 06/11/2019, de World Federation for Culture Collections (WFCC) Sitio web: http://www.wfcc.info/pdf/Guidelines_e.pdf





8

**Evaluación de
viabilidad de
microorganismos**



Capítulo 8

Evaluación de viabilidad de microorganismos

Matías Guerra P.
Bioingeniero, Mg., INIA Quilamapu

Jean Franco Castro F.
Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

8.1. Concepto de viabilidad microbiana

En el lenguaje común, el uso de los términos “viable” y “viabilidad” refleja nuestra expectativa de que entidades puedan sobrevivir, o algo pueda llevarse a cabo durante un período, respectivamente. Según el diccionario de la Real Academia Española, en biología, la palabra “viable” significa que puede vivir. En microbiología, la viabilidad se define como la habilidad de una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en medio de cultivo sólido o producir turbidez en un medio líquido apropiado. Operacionalmente, en una colección de cultivos microbianos, para determinar la viabilidad, pureza y preservar el depósito en el tiempo, se utiliza la capacidad de los microorganismos para multiplicarse y crecer en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio.

8.2. Procedimientos para evaluar la viabilidad microbiana en colecciones de cultivo

La viabilidad de las células microbianas se evalúa rutinariamente en una colección de cultivo después del proceso de preservación, ya sea, por liofilización o criopreservación. Para ello, se determina su habilidad de crecer, dividirse y formar colonias en medios de cultivo específicos.

En la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM), para la evaluación de viabilidad de hongos y bacterias, primero la muestra preservada debe ser regenerada. Luego se realizan diluciones seriadas, las cuales se usan para inocular un medio de cultivo específico, y finalmente se evalúa el crecimiento y la pureza. (Figura 8.1.). El objetivo de este capítulo es analizar las principales metodologías usadas para evaluar la viabilidad y los factores que influyen la sobrevivencia de los microorganismos preservados por los métodos de liofilización y criopreservación.



Figura 8.1. Esquema general del proceso de evaluación de viabilidad de microorganismos posterior al proceso de preservación.

8.2.1. Evaluación de viabilidad de bacterias

La viabilidad en bacterias se puede determinar de forma sencilla, evaluando el crecimiento bacteriano en medios nutritivos. Para ello, se pueden enumerar las colonias crecidas en medios de cultivos sólidos, donde el resultado se expresa en unidades formadoras de colonias por mL (UFC por mL) y no como células bacterianas por mL, ya que más de una célula podría generar una colonia. Para poder determinar las UFC por mL sobre medio sólido, se debe realizar una dilución seriada de un inóculo microbiano en tubos con solución fisiológica de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%. Luego, se inoculan 100 μ L en medio de cultivo sólido de cada una de las diluciones (por lo general, se recomienda utilizar una dilución de 10^{-5} ó 10^{-6} para poder realizar el conteo de colonias), se disemina con rastrillo bacteriológico, se incuba y se hace el conteo de colonias a las 24 o 48 horas (Foto 8.1.A.).

Otra metodología que permite evaluar la viabilidad en cultivos líquidos es la espectrofotometría, la cual estima el crecimiento bacteriano al detectar el incremento de la densidad óptica. Esta evaluación se realiza en un espectrofotómetro, normalmente programado a una longitud de onda (λ) de 600 nm (Foto 8.1.B.).

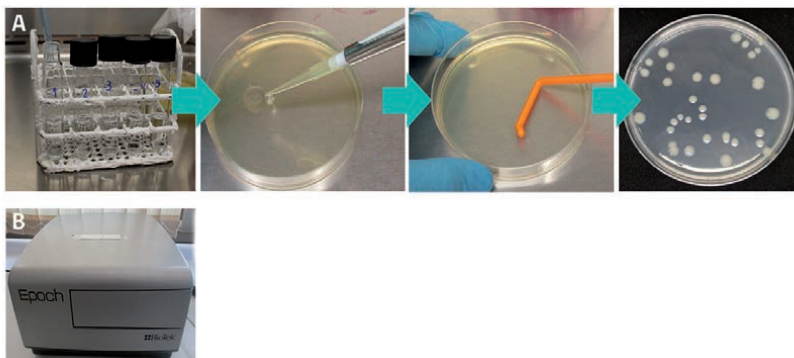


Foto 8.1. Evaluación de la viabilidad por crecimiento bacteriano. (A) Conteo de colonias crecidas en medio sólido; (B) evaluación de la densidad óptica.

La viabilidad en aquellas bacterias que no crecen en medios de cultivo, se puede determinar evaluando la integridad de la membrana celular como criterio de viabilidad. La membrana celular sustenta prácticamente todos los procesos que ocurren dentro de la célula; por ejemplo, es vital para la generación del gradiente electroquímico que se origina durante la producción de energía y la cadena transportadora de electrones. Metodologías como microscopía de epifluorescencia, permiten realizar conteos directos de células con su membrana íntegra. Para ello se utilizan en conjunto tinciones fluorescentes como el ioduro de propidio, que sólo tiñe aquellas células que han perdido la integridad de su membrana, y tinciones que marcan a todas las células, lo cual permite cuantificar en conjunto las células vivas y muertas (Foto 8.2.).

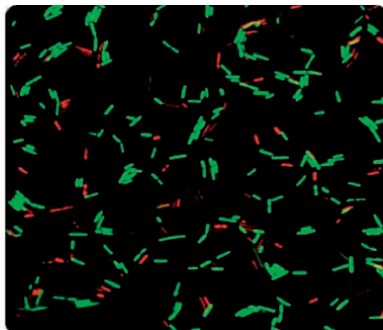


Foto 8.2. Evaluación de la viabilidad bacteriana por integridad de membrana. Las células verdes corresponden a las que se encuentran viables (vivas) y las rojas a las células que han perdido su integridad de membrana (muertas). Imagen adaptada del manual del kit Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity de ABP Biosciences.

8.2.2. Evaluación de viabilidad de hongos

En hongos, la viabilidad se puede determinar al observar crecimiento de micelio (hongos no esporuladores) en medios de cultivo sólido y al contabilizar, por microscopía óptica, las esporas germinadas (hongos esporuladores) (Foto 8.3.A. y 8.3.B.).

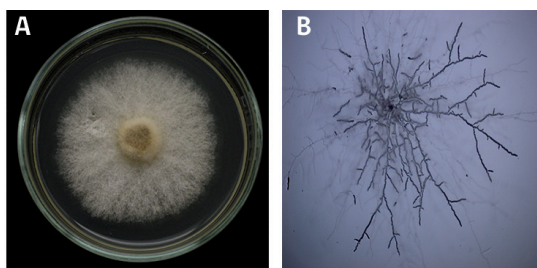


Foto 8.3. Evaluación de la viabilidad en hongos. (A) Crecimiento de micelio en medio de cultivo sólido; (B) conteo por microscopía de esporas germinadas en medio de cultivo.

8.3. Factores que afectan la viabilidad microbiana en el proceso de preservación

Las metodologías descritas para determinar la viabilidad microbiana en el punto anterior, son utilizadas de manera rutinaria para corroborar la capacidad de sobrevivencia de los microorganismos preservados, ya sea por liofilización o criopreservación.

Se puede preservar una variedad de materiales biológicos, utilizando protocolos estándar y relativamente fáciles de aplicar, obteniendo como resultado una alta viabilidad celular. Sin embargo, hay casos en que la preservación del microorganismo requiere de estrategias diseñadas según el género, especie o incluso según la cepa microbiana con la que se trabaja. Estas estrategias incluyen el uso de agentes protectores no convencionales, uso de velocidades de enfriamiento y calentamiento optimizadas y de protocolos de regeneración del cultivo microbiano.

Mientras que las muestras criopreservadas se almacenan típicamente entre -80 y -190 °C, las muestras liofilizadas se pueden almacenar a temperatura ambiente, lo que tiene claras ventajas para el almacenamiento y el transporte. No obstante, el proceso de liofilización es generalmente más perjudicial en

comparación con la criopreservación. Por lo tanto, se requiere un manejo adecuado de los diversos factores que afectan el éxito de los procesos de preservación. A continuación, se analizan los factores que afectan los procesos de liofilización y criopreservación sobre la viabilidad celular.

8.3.1. Factores que afectan la viabilidad celular en la liofilización

La liofilización consta de un proceso de preparación de muestras, inoculación de un cultivo microbiano en una solución, adición de lioprotectores, congelamiento, secado por sublimación, sellado de viales, preservación y regeneración. La liofilización de células debe minimizar la pérdida de viabilidad en el tiempo y tolerar los cambios ambientales. Para ello, se requiere tener en consideración de diversos factores que afectan la viabilidad, los cuales se detallan a continuación.

Durante el paso de congelamiento de la muestra, la formación de cristales de hielo o el incremento interno de la concentración de solutos pueden ocasionar daño en la célula, principalmente en la membrana citoplasmática. El correcto sellado de viales en condiciones de vacío también tiene una gran influencia en la viabilidad de la muestra preservada, ya que la exposición a gases reactivos de la atmósfera como oxígeno, dióxido de carbono o la humedad, causan degradación y escasa estabilidad de la muestra en el tiempo.

La formulación utilizada en la liofilización influye en la viabilidad de los microorganismos preservados. Ésta debe ser determinada para cada cepa en base a la experimentación; no obstante, muchas veces se siguen recetas estándar por grupo taxonómico. Las formulaciones tienen la función de minimizar el daño celular provocado por los cristales de hielo, por la alta presión osmótica resultado de la pérdida de agua, y la desecación excesiva y oxidación por gases reactivos. Formulaciones a base de disacáridos como sacarosa y trehalosa disminuyen los efectos deletéreos en la membrana y previene la desnaturalización de proteínas. La leche descremada es una de las formulaciones más utilizadas en la liofilización y en la regeneración de células preservadas. Esta mezcla posee macromoléculas como la lactosa (disacárido), contiene aminoácidos que ayudan en la reparación de daños y otorgan energía en la regeneración. En la CChRGM se ha verificado que la utilización de leche descremada suplementada con trehalosa al 7% incrementa la viabilidad en algunas levaduras y hongos como *Trichoderma* spp.

8.3.2. Factores que afectan la viabilidad celular en la criopreservación

La criopreservación permite mantener viables cultivos microbianos por largos periodos; no obstante, sin el adecuado manejo y protección de las muestras a preservar, el proceso es prácticamente letal para las células. Los daños ocasionados están dominados por el congelamiento del agua, el incremento de la osmolaridad interna y el proceso de descongelamiento. A continuación, se describen los principales mecanismos que dañan la célula en la criopreservación y los factores que incrementan la viabilidad post-criopreservación.

El congelamiento del agua genera, en primera instancia, la formación de cristales de hielo en la célula tanto interna como externamente, no obstante, es en el interior donde ocasionan daños directos en las estructuras y en la membrana citoplasmática. Externamente, la formación de cristales de hielo induce el movimiento de agua desde el interior de la célula al medio extracelular, lo cual incrementa la presión osmótica en el citoplasma y provoca la precipitación de macromoléculas y proteínas. Este golpe osmótico sería la principal causa de pérdida de viabilidad.

Los daños antes mencionados se relacionan con la tasa de congelamiento a la que son expuestas las células. Por ejemplo, un rápido congelamiento provoca la formación de cristales de hielo en el interior de la célula y, por otro lado, si la disminución de la temperatura es muy lenta, la célula se deshidrata excesivamente, generando un incremento interno de la concentración de solutos, aumento al que las células son especialmente sensibles, lo que ocasiona pérdidas de la viabilidad celular (Figura 8.2.A.). Por ello, llevar a cabo el descenso de temperatura a una tasa óptima resulta fundamental en el éxito de la criopreservación (Figura 8.2.B.). En la CChRGM se utiliza el dispositivo llamado Mr. Frosty^{TM 2} que permite acercarse a la tasa óptima disminución de temperatura de muchos microorganismos, logrando un descenso programado de temperatura de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto, cuando el descenso se inicia desde los $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta temperaturas menores a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 8.3.).

²La mención de productos comerciales o empresas, no significan una recomendación INIA. Sólo se realiza a modo ilustrativo.

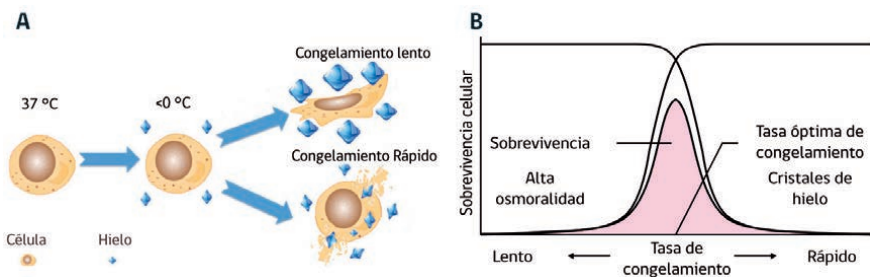


Figura 8.2. Efecto de la tasa de congelamiento en la viabilidad. (A) Una abrupta disminución en la temperatura induce la formación de cristales de hielo que dañan la integridad celular, mientras que un lento congelamiento ocasiona un incremento de la osmolaridad interna el cual, finalmente, lleva a la muerte celular; (B) la tasa óptima de congelamiento (mayor sobrevivencia) corresponde a un punto intermedio entre un rápido descenso de temperatura y un lento congelamiento. Imagen (A) adaptada de Yang et al., (2016); Imagen (B) adaptada de Perfecting Cryoreservation VIA Freeze™ de Kyodo International Inc. y Hunt, 2017.

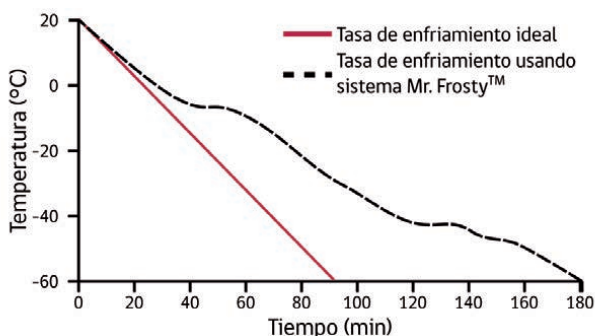


Figura 8.3. Descenso controlado de temperatura utilizando dispositivos como Mr. Frosty™. Imagen adaptada del manual *A guide for proper cryogenic preservation* de ThermoScientific.

Los crioprotectores juegan un rol importante al incrementar la sobrevivencia de un cultivo microbiano sometido a criopreservación. La utilización de estos solutos provoca en las células el desplazamiento de moléculas de agua por osmosis y de solutos por difusión. La menor proporción de agua dentro de la célula disminuye la formación de cristales de hielo, aumenta la fracción no congelada, limita el grado de deformación de las células y reduce la concentración de electrolitos en la célula y en la zona no congelada (Figura 8.4.). Uno de los crioprotectores más utilizados en las colecciones de cultivo es

el glicerol, capaz de bajar el punto de congelamiento del agua. No obstante, su principal modo de acción se debe a que reemplaza las moléculas de agua en el citosol, evitando el colapso de la célula y disminuyendo los efectos deletéreos de la elevada concentración de sales. Entre las características principales que debe tener un buen crioprotector, está una alta solubilidad en agua, sin variar a bajas temperaturas, atravesar fácilmente la membrana y tener una baja toxicidad para poder usarlo a altas concentraciones. El Cuadro 8.1. muestra los crioprotectores más utilizados.

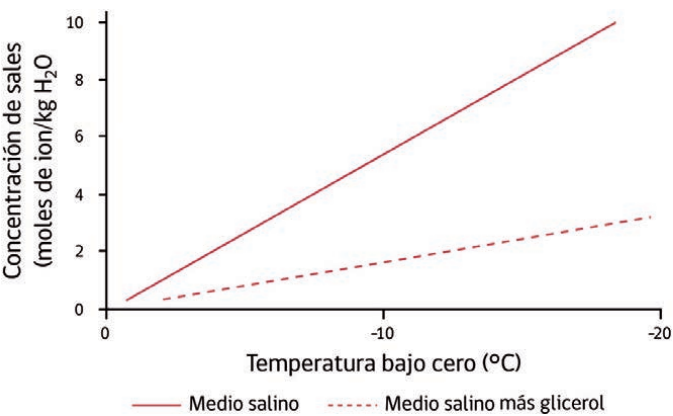


Figura 8.4. La presencia de crioprotectores (glicerol) disminuye la concentración de sales en la fracción no congelada y en el interior de la célula. La línea continua representa las células en medio salino; la línea discontinua representa las células en medio salino suplementado con glicerol. Imagen adaptada de FAO (2012).

Cuadro 8.1. Principales moléculas utilizadas como crioprotectores agrupados según su estructura química*.

Alcoholes	Azúcares	Polímeros	Sulfóxidos y amidas	Aminas
Metanol	Glucosa	Polietilenglicol	Dimetilsulfóxido	Prolina
Etanol	Galactosa	Polivinilpirrolidona	Acetamida	Glutamina
Glicerol	Lactosa	Dextrano	Formamida	Betaína
Etilenglicol	Sacarosa	Ficol	Dimetilacetamida	
Propilenglicol	Trehalosa	Almidón hidroxietílico		

* Datos de Elliott et al., 2017.

La concentración de los crioprotectores tiene un efecto en el resultado del proceso de preservación de microorganismos. La combinación de la concentración del crioprotector y la tasa de disminución de temperatura afectan la sobrevivencia celular en el proceso de criopreservación (Figura 8.5). Células expuestas a bajas concentraciones de crioprotectores y a altas tasas de congelamiento tienen una reducida sobrevivencia, mientras que al aumentar la concentración del crioprotector y a una menor tasa de congelamiento, se obtienen los mejores resultados de sobrevivencia.

Las adecuadas condiciones de criopreservación se deben determinar de forma empírica para cada cepa microbiana. No obstante, el tipo de crioprotector, su concentración y la tasa de disminución de temperatura se usan de forma estándar, con modificaciones sólo en aquellas cepas con muy baja viabilidad. En la CChRGM se utiliza principalmente glicerol entre 10 y 15%, con un descenso programado de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto al utilizar el sistema Mr. FrostyTM.

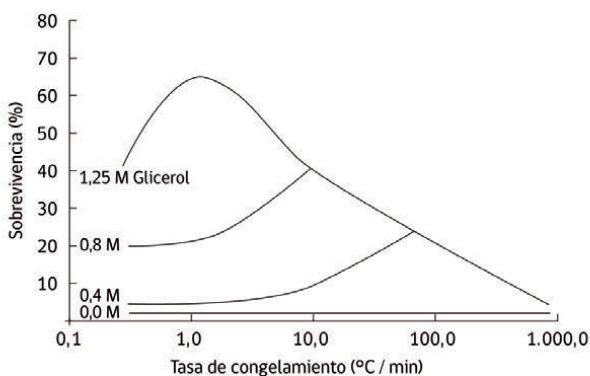


Figura 8.5. La tasa óptima de congelamiento depende de la tasa de disminución de temperatura y la concentración del crioprotector. A concentraciones entre 10 y 20% de glicerol, con tasas de disminución de temperatura cercanas a $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto, se obtiene la mayor sobrevivencia en varios géneros microbianos. Imagen adaptada de Pegg et al. (2009).

El proceso de descongelamiento en la viabilidad celular muchas veces no recibe la misma atención o importancia. Las células pueden permanecer viables por largos periodos mientras están congeladas, pero presentar una viabilidad deficiente cuando el descongelamiento de la muestra es desprolijo. En este sentido, la tasa de descongelamiento tiene una gran relevancia en los resultados de sobrevivencia obtenidos post-criopreservación (Figura 8.6).

Un lento descongelamiento provoca en las células la recrystalización del hielo, fenómeno que puede llegar a ser hasta más dañino que los generados en el congelamiento inicial. Por otro lado, un descongelamiento rápido, involucra generalmente la utilización de calor excesivo, el cual terminará igualmente siendo perjudicial para las células. Se recomienda descongelar las muestras en un recipiente con agua a una temperatura entre 30 y 37 °C.

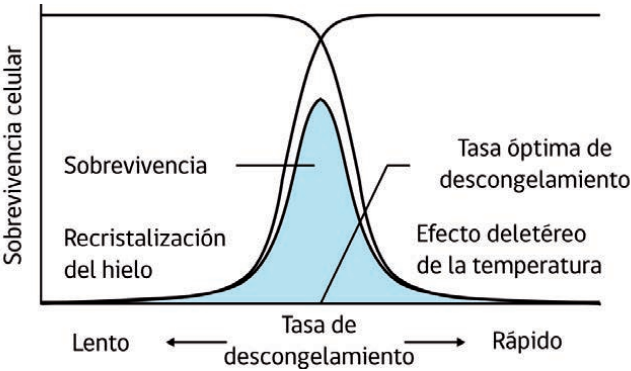


Figura 8.6. Efecto de la tasa de descongelamiento en la sobrevivencia celular post-criopreservación. Un lento descongelamiento genera recrystalización del hielo, mientras que un rápido descongelamiento genera estrés por calor. Imagen modificada de Hunt C. J (2017).

8.4. Evaluación de viabilidad microbiana en una colección de cultivos

En la CChRGM, durante la preparación de las muestras tanto para liofilización como criopreservación, se destina un vial testigo para la evaluación de la viabilidad, paso realizado tras 48 horas (como mínimo) de la preservación. En este paso, las células liofilizadas o criopreservadas son regeneradas o descongeladas, respectivamente, inoculadas en medio nutritivo, incubadas en cámaras de cultivo y finalmente se evalúa su crecimiento.

8.4.1. Equipamiento e insumos para evaluar viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad microbiana requiere el uso de cámaras de incubación que permitan el crecimiento microbiano a una temperatura estable y cercana a la óptima. En la CChRGM se utiliza, principalmente, 25 °C para hongos, entre 30 y 38 °C para bacterias. Para el cultivo de cepas anaeróbicas estrictas se requiere el uso de condiciones especiales que limiten la presencia de oxígeno como, por ejemplo, los jarros de anaerobiosis y un reactivo para generar un ambiente anaeróbico en el interior de este jarro. También es necesario disponer de un gabinete de bioseguridad que permita trabajar las muestras preservadas en un ambiente libre de contaminación y resguardar la seguridad del trabajador y del entorno.

El uso de microscopios es requerido para evaluar la viabilidad. Para la evaluación de las esporas germinadas se utiliza un microscopio óptico en el aumento 10x que permite visualizar el crecimiento del micelio desde la espora recién germinada. Un microscopio de epifluorescencia permite la visualización y conteo de células vivas y muertas al teñir las células con tinciones fluorescentes. La cámara de Neubauer es un dispositivo que permite, por microscopía óptica, el conteo de esporas y células totales en una solución líquida, y se utiliza para determinar el número inicial de esporas inoculadas en una solución. Finalmente, un espectrofotómetro es utilizado para medir el incremento de la densidad óptica de un cultivo en medio líquido. La densidad óptica se puede correlacionar con el número de células por mL al estandarizar previamente estos parámetros.

Para evaluar la viabilidad, todos los materiales utilizados deben estar estériles. En la CChRGM se utilizan placas Petri con medio nutritivo para realizar los cultivos, tubos con agua para hacer las diluciones, tubos de microcentrífuga, puntas de micropipeta, micropipeta, alcohol de quemar, rastrillo bacteriológico, asa curva bacteriológica, frasco con agua entre 30 y 37 °C, flotador para tubos de microcentrífuga y pinzas.

8.4.2. Evaluación de la viabilidad en muestras liofilizadas

Para evaluar la viabilidad de las células preservadas por liofilización, la muestra es regenerada adicionando el doble del volumen del osmoacondionante usado

inicialmente, y se espera unos minutos para lograr una correcta hidratación. Generalmente se utiliza leche descremada al 10% como osmoacondicionante, ya que contiene azúcares y aminoácidos que ayudan a la regeneración y crecimiento.

En la CChRGM, para evaluar el éxito del proceso de liofilización, se realiza un conteo de las células o esporas viables previo a la liofilización y tras 48 horas (como mínimo) de realizada la preservación. Esto permite determinar el porcentaje de sobrevivencia tras el proceso. Para bacterias se considera adecuada una sobrevivencia mayor al 0,1 %, ya que un menor porcentaje se considera muerte bacteriana. También se considera adecuado un conteo de colonias superior a $1 \cdot 10^6$ UFC por mL.

Dependiendo del tipo de microorganismo, las muestras testigos, previas a ser liofilizadas y luego de ser regeneradas, se procesan de distinta manera. En bacterias y levaduras se realizan diluciones seriadas de la muestra, se inoculan 100 μ L en el medio nutritivo sólido recomendado por el depositante, se incuban en cámaras de cultivo (a una temperatura de 25 ó 30 °C), se monitorea pureza y, finalmente, se realiza el conteo de colonias crecidas. Para hongos esporuladores se hacen diluciones seriadas, se inoculan 100 μ L en medio nutritivo sólido (aproximadamente $1 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^7$ esporas por mL) y se incuban generalmente a 25 °C. A las 24 ó 48 horas se determina el porcentaje de las esporas germinadas al microscopio.

Otra metodología utilizada en la liofilización de hongos no esporuladores incluye el uso de soporte sólido con semillas de mijo infectadas por el micelio del microorganismo a preservar. Para ello, 25 semillas liofilizadas e infectadas con el hongo son colocadas sobre el medio de cultivo sólido, para analizar el crecimiento de micelio a partir de ellas.

8.4.3. Evaluación de la viabilidad en muestras criopreservadas

El proceso de evaluación de viabilidad post-criopreservación consiste en determinar la capacidad de crecimiento de las células preservadas por sistema de congelación. Un vial criogénico testigo es retirado desde la caja almacenada en el congelador a -150 °C y luego es sumergido en un recipiente con agua a una temperatura entre 30 y 37 °C para asegurar una óptima tasa de descongelamiento. Posteriormente, cuando el contenido

del vial es descongelado, éste se debe abrir en condiciones estériles dentro de un gabinete de bioseguridad y se debe sembrar en un medio nutritivo, dependiendo del tipo de microorganismo (Foto 8.4.).

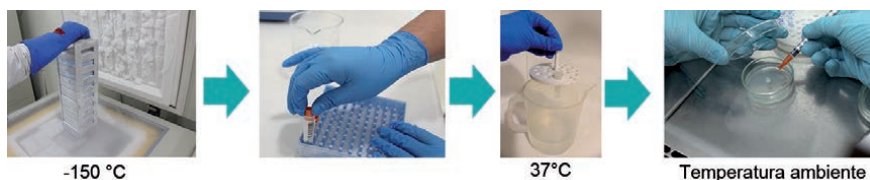


Foto 8.4. Procedimiento para descongelar muestras desde congelador a -150 °C.

Para el caso de hongos no esporuladores (Foto 8.5.A.) se debe sacar del interior del vial criogénico un trozo de agar con micelio y depositarlo en centro de una placa Petri con medio nutritivo sólido; generalmente se incuban a 25 °C y se evalúa el crecimiento del micelio. En bacterias y levaduras, primero se realizan diluciones seriadas desde la muestra descongelada (Foto 8.5.B.), se inoculan 100 µL en medio nutritivo sólido, se incuban en cámaras de cultivo (25 ó 30 °C) y finalmente se realiza el conteo de colonias crecidas. También con un asa curva se puede realizar un rayado en medio sólido, lo que permite evaluar la viabilidad y pureza del microorganismo. Para hongos esporuladores se hacen diluciones seriadas, se inoculan 100 µL en medio nutritivo sólido (aproximadamente $1 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^7$ esporas por mL) y se incuban, generalmente, a 25 °C. A las 24 ó 48 horas se realiza el conteo de las esporas germinadas en el microscopio (esporas con tubo germinativo).

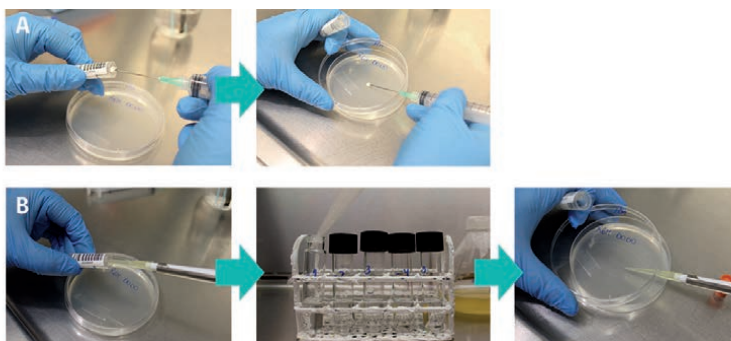


Foto 8.5. Procedimiento de siembra de cultivo microbiano para la evaluación de viabilidad post-tratamiento de criopreservación. (A) Siembra de hongos no esporuladores; (B) dilución y siembra de hongo esporulador, bacteria o levadura.

8.5. Registros asociados al procedimiento de evaluación de viabilidad

Todas las actividades realizadas durante los procesos de criopreservación y liofilización deben ser registradas en un documento oficial, tanto en papel como en un sistema digital, por ejemplo, una planilla de cálculo. En la CChRGM se registran los datos mencionados en el Cuadro 8.2.

Cuadro 8.2. Datos registrados durante el proceso de evaluación de viabilidad post-tratamiento de preservación.

Registro	Dato a registrar
Viabilidad post-criopreservación	Número de ingreso, N° de colección oficial, fecha preservación, fecha evaluación viabilidad, N° de días de preservación, medio de cultivo utilizado, tipo de microorganismo, dilución, conteo o porcentaje de germinación, observaciones y visto bueno.
Viabilidad post-liofilización	Número de ingreso, N° de colección oficial, fecha evaluación viabilidad, N° de días preservado, medio de cultivo utilizado, tipo de microorganismo, dilución previo liofilización, conteo o porcentaje de germinación previo liofilización, dilución post-liofilización, conteo o porcentaje de germinación post-liofilización, observaciones y visto bueno.

8.6. Literatura consultada

Biosciences. (2018). Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity Kit for Bacteria Cells
Catalog Number: A018. 12/11/2019, De Biosciences Sitio web: <http://www.abpbio.com/wp-content/uploads/2018/01/A018.pdf>

Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. De *Cryobiology*, 76, 74-91.

FAO (2012). Cryoconservation of animal genetic resources, De FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.

Frank P. Simione (2012). A guide for proper cryogenic preservation. De Thermo Fisher Scientific Sitio <https://static.thermoscientific.com/images/D211111~.pdf>

Hunt, C. J. (2017). Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. De *Stem Cell Banking* (pp. 50). Humana Press, New York, NY.

Pegg, D. E. (2009). Principles of Cryopreservation. de *Preservation of Human oocytes* (pp. 34-46). CRC Press.

Yang, J., Cai, N., Zhai, H., Zhang, J., Zhu, Y., & Zhang, L. (2016). Natural zwitterionic betaine enables cells to survive ultrarapid cryopreservation. *Scientific Reports*, 6, 37458.





9

Identificación de microorganismos



Capítulo 9

Identificación de microorganismos

Jorge Carrasco F.

Ingeniero en biotecnología vegetal, Mg., INIA Quilamapu

Paz Millas Ortiz

Ingeniero agrónomo, Dr., INIA Quilamapu

Cecilia Santelices S.

Técnico forestal, INIA Quilamapu

Jean Franco Castro F.

Bioingeniero, Dr., INIA Quilamapu

9.1. Importancia de la identificación de microorganismos

Los microorganismos están presentes en prácticamente todos los lugares de la Tierra y, a través de diversos mecanismos y adaptaciones, cumplen un rol relevante para el mantenimiento de la vida en el planeta. En la actualidad, los microorganismos son utilizados en distintos rubros de interés como la industria farmacéutica, agrícola, alimenticia, ambiental, minera, entre otras, por lo que contar con herramientas que permitan identificar o detectar microorganismos de interés es de gran importancia, entendiendo que un microorganismo debe estar debidamente identificado cuando es utilizado en algún proceso.

La identificación de los microorganismos es un proceso de gran importancia para una colección de cultivos microbianos. Es uno de los requisitos esenciales para que una cepa sea ingresada oficialmente a una colección y, a su vez, permite direccionar la búsqueda de una aplicación al microorganismo identificado. Los métodos de identificación se pueden dividir en dos grupos: fenotípicos y genotípicos, teniendo presente que el fenotipo corresponde a las características que se visualizan en un organismo como morfología, requerimientos nutricionales o el comportamiento frente a alguna molécula, en

tanto que el genotipo es la información hereditaria completa de un organismo codificada en su ADN. Es importante dejar claro que el proceso de identificación de microorganismos consta de múltiples etapas que combinan la información fenotípica y genotípica.

La identificación de microorganismos es parte fundamental del quehacer de una colección de cultivos microbianos. Estas entidades ofrecen servicios de identificación de microorganismos a la comunidad científica e industrial, así como distribución de cepas a terceros; por tanto, la mantención de cultivos correctamente identificados es crucial. El objetivo de este capítulo es describir las metodologías fenotípicas y moleculares para la identificación de un microorganismo (Figura 9.1.), las cuales se han implementado en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM).



Figura 9.1. Esquema general del proceso de identificación de microorganismos por técnicas fenotípicas y genotípicas.

9.2. Identificación fenotípica de microorganismos

Los métodos fenotípicos permiten, usualmente, identificar aislados microbianos hasta nivel de género y, en algunos casos, hasta nivel de especie en función del número de observaciones macro y microscópicas, sumado a pruebas bioquímicas.

9.2.1. Metodología para análisis fenotípico en hongos

Para el caso de identificación de hongos se utiliza comúnmente la lupa estereoscópica y el microscopio óptico para la determinación de diferentes estructuras de un hongo (hifas, conidióforos, conidios o esporas, carpóforos, entre otros). Muchos hongos requieren nutrientes específicos o condiciones de cultivo especiales para gatillar el desarrollo de estructuras morfológicas características, por lo que se recomienda utilizar literatura científica especializada para planificar la metodología (Cuadro 9.1.).

Cuadro 9.1. Libros más utilizados para realizar identificaciones morfológicas de diversos géneros fúngicos.

Libro	Editores, año
Fungal Biodiversity	P.W. Crous, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald & R.A. Samson. 2009.
Manual de microhongos filamentosos comunes. I.	E. Piontelli Lafort. 2015.
Illustrated Genera of Ascomycetes	R. Hanlin. 1998.
The Yeasts	C. Kurtzman, J.W. Fell & T. Boekhout. 2011.

9.2.2. Metodología para análisis fenotípico en bacterias

Para el caso de bacterias, las evaluaciones fenotípicas pueden incluir morfología de colonias, forma de las células, presencia y disposición de flagelos, presencia de endosporas y tinción de Gram entre otras.

La técnica de tinción Gram es empleada para diferenciar las bacterias en dos grupos, las bacterias Gram (+) y Gram (-) y, a su vez, permite visualizar las características morfológicas de las células bacterianas mediante el uso de microscopio óptico, normalmente utilizando un aumento de 100x. Como metodología para la tinción de Gram se emplean cuatro pasos: (i) tinción inicial con cristal violeta, (ii) solución fijadora y tinción de yodo-potásico, (iii) aplicación de una solución decolorante de alcohol o acetona y (iv) una tinción diferenciadora de safranina. Como resultado, en el caso de una bacteria Gram (+), se obtienen células de tonalidad violeta, mientras que para Gram (-) se observan células de tonalidad rojiza.

A diferencia de la identificación en hongos, las características morfológicas en bacteria no permiten identificar a nivel de especie y en la mayoría de los casos tampoco permiten determinar el género. Por esta razón, para la identificación de bacterias se utilizan diversas pruebas de caracterización bioquímica que permiten complementar la caracterización morfológica y llegar a identificar la especie o el género en la mayoría de los casos. Entre estas pruebas o test bioquímicos se encuentran: crecimiento a distintas concentraciones de NaCl y pH, gradientes de temperaturas, crecimiento en condiciones anaeróbicas, actividad oxidasa, peroxidasa, producción de ácidos a partir de la degradación de diferentes azúcares, utilización de diferentes fuentes carbonadas, hidrólisis de caseína, esculina, gelatina, caseína, etc.

Hoy en día existen pruebas que están disponibles comercialmente en kits. Es el caso de las tiras API® de bioMérieux³ que determinan varias reacciones para distintos grupos de bacterias. Las tiras API 20 E, diseñadas para la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram (-), tiene 23 pruebas bioquímicas que permiten identificar 108 géneros y 104 especies al utilizar el programa APILAB (bioMérieux). Estas tiras se pueden leer manualmente o mediante lectores especializados. También existen placas para determinar una huella metabólica de especies bacterianas. Para este tipo de determinación, la empresa Biolog Inc.³ tiene un producto llamado Biolog GEN III MicroPlate^{TM 3} para bacterias aeróbicas y Biolog AN MicroPlate^{TM 3} para bacterias anaeróbicas. Ambas placas cuentan con 96 pocillos con distintos compuestos carbonados y pruebas bioquímicas que permiten determinar un patrón metabólico de las bacterias a través del viraje de la coloración redox de tetrazolio que indica colorimétricamente la utilización de fuentes de carbono o resistencia a productos químicos inhibidores como antibióticos. Los patrones son comparados con el programa y la base de datos Biolog MicroLog^{TM 3} para proporcionar una identificación.

Otra forma de identificación bacteriana es a través de la quimiotaxonomía, la cual se sustenta de las variaciones en la composición química de las células microbianas que permiten su identificación y clasificación. Estos análisis están dirigidos a la pared celular y membrana plasmática en relación al análisis de azúcares, lípidos polares, ácidos grasos, menaquinonas, ácido diaminopimélico, entre otros. Para esto se emplean, como principales técnicas, la cromatografía líquida (HPLC), cromatografía gaseosa y cromatografía en capa fina.

Una buena planificación de la metodología para el análisis fenotípico de bacterias requiere de revisión bibliográfica relevante en este tema, por tanto, se recomiendan libros que recopilan información morfológica, filogenética y bioquímica de múltiples géneros bacterianos (Cuadro 9.2.).

³La mención de productos comerciales o empresas, no significan una recomendación INIA. Sólo se realiza a modo ilustrativo.

Cuadro 9.2. Libros más utilizados para planificar identificaciones morfológicas de géneros bacterianos.

Libro	Editores, año.	Volúmenes o capítulos
The Prokaryotes	Rosenberg, E., et al., 2014	Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea.
		Actinobacteria.
		Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria.
		Firmicutes and Tenericutes.
		Gammaproteobacteria.
		Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria.
		Prokaryotic Physiology and Biochemistry.
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology	Boone, D.R. y Castenholz, R.W., 2001	The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria.
	Brenner, D.J., Krieg, N.R. y Staley, J.T., 2005	The Proteobacteria.
	De Vos, P, et al., 2009	The Firmicutes.
	Krieg, N.R., et al., 2011	The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes.
	Goodfellow, M., et al., 2012	The Actinobacteria.
Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria	Schaad N.W. 2001	I. Initial Identification of Common Genera. II. Gram-negative bacteria: <i>Agrobacterium</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Xylella fastidiosa</i> . II. Gram-positive bacteria: <i>Coryneform</i> Plant Pathogens, <i>Streptomyces scabies</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> . IV. Cell Wall-Free Prokaryotes.

9.3. Identificación genotípica de microorganismos

El rápido progreso de la biología molecular ha permitido el desarrollo de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos para la identificación de microorganismos con alta resolución y que sería complejo de determinar mediante técnicas morfológicas y bioquímicas.

Para llevar a cabo la correcta identificación molecular de un microorganismo (ya sea hongo o bacteria), existen genes microbianos específicos, los cuales son comunes para un género en particular y funcionalmente constantes. La técnica de PCR permite amplificar un gen o un fragmento de ADN, también llamado amplicón, cuya secuencia nucleotídica sirve como “huella digital” para asociar un microorganismo desconocido de un género o especie microbiana conocida. Dentro de los genes usados para la identificación de bacterias y hongos existen algunos universales y otros específicos de algunos géneros, los cuales se detallan en los Cuadros 9.3. y 9.4., respectivamente.

Cuadro 9.3. Marcadores moleculares más usados para la identificación de bacterias.

Nombre del marcador	Aplicación	Referencia
Acido ribonucleico ribosómico ARNr (5S-16S-23S)	Universal para bacteria	Eden et al., 1991; Weidner et al., 1996; Frank et al., 2008.
ADN girasa (<i>gyrA gyrB</i>)	Universal para bacteria	Onodera & Sato, 1999.
ARN polimerasa (<i>rpoA-rpoB-rpoC-rpoD</i>)	Universal para bacteria	Fujita et al., 1995; Ventura et al., 2006; Rigouts et al., 2007; Guo et al., 2012.
Diaminobutirato 2-oxoglutarato transaminasa (<i>ectBC</i>)	<i>Halomonas variabilis</i> , <i>Halomonadaceae</i>	Arahal et al., 2007, Okamoto et al., 2004.
Proteína iniciadora de la replicación cromosómica (<i>dnaA</i>)	<i>Rhizobium meliloti</i>	Margolin et al., 1995.
Fenilalanina-ARN sintasa (<i>pheS</i>)	<i>Enterococcus</i> sp., <i>Lactobacilli</i> sp.	Naser et al., 2005; Naser et al., 2009.

Cuadro 9.4. Marcadores moleculares más usados para la identificación de hongos.

Nombre del marcador	Aplicación	Referencia
Ácido ribonucleico ribosómico ARNr (5.8S-28S)	Universal para hongo	White et al., 1990.
Factor de elongación (<i>tef1</i>)	Universal para hongo, en especial <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.	O'Donnell et al., 1998; O'Donnell., 2000; Geiser et al., 2001.
ARN polimerasa II (<i>RPB1-RPB2</i>)	Universal para hongo	Liu et al., 2004.
Calmodulina (<i>cam</i>)	Universal para hongo, en especial <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	Hong et al., 2006.
Beta-tubulina (<i>BenA</i>)	Universal para hongo	Glass & Donaldson 1995.
Región intergenica <i>bloc</i>	Para género <i>Beauveria</i>	Rehner et al., 2011.
Región intergenica <i>MzIGS</i>	Para género <i>Metarhizium</i>	Kepler & Rehner, 2013.

La realización de la identificación molecular de microorganismos se lleva a cabo en siete etapas, las cuales se detallan a continuación.

9.3.1. Etapa 1. Recepción de cultivo microbiano puro

Para llevar a cabo la identificación molecular de un microorganismo es necesario contar con cultivos axénicos o puros, los cuales se pueden describir como aquellos que contienen un sólo microorganismo, sin contaminantes. En la CChRGM, toda identificación molecular se realiza a partir de cultivos puros, cuya manipulación es realizada por personal técnico autorizado a acceder a la colección. Una vez verificada la pureza del material mediante técnicas de microscopía, este cultivo será entregado a la persona encargada de realizar la extracción de ADN.

Para la obtención de un cultivo puro en el caso de bacterias o de levaduras, se deben obtener colonias aisladas (Foto 9.1.A.) y para el caso de hongos se deben obtener los cultivos puros a partir de la punta de una hifa o de una espora germinada (Foto 9.1.B.), procurando emplear material estéril al momento de manipular el cultivo microbiano. Para la obtención de cultivos

puros, se recomienda el uso de medios de cultivo selectivos para el género microbiano de interés, ya sea a través del uso de antibióticos, fungicidas u otros compuestos en concentraciones específicas, con capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos no deseados. Siempre se debe revisar la pureza del cultivo microbiano antes de realizar el análisis molecular.

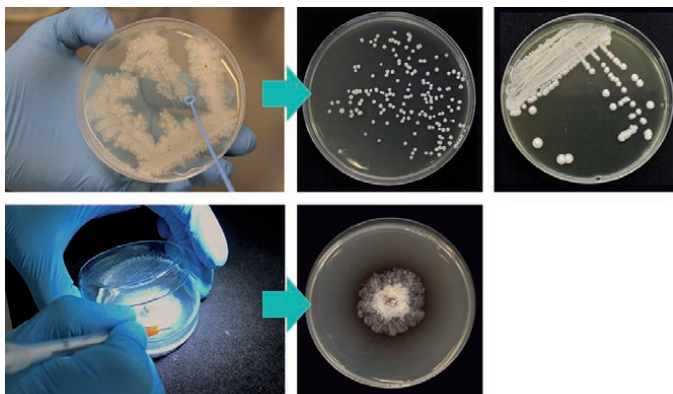


Foto 9.1. Obtención de cultivos microbianos puros para extracción de ADN genómico. (A) Repique de una colonia aislada de bacteria o levadura; (B) subcultivo de un hongo desde punta de hifa.

9.3.2. Etapa 2. Extracción de ácido nucleicos desde microorganismos

Esta etapa consiste en obtener ADN genómico desde compartimentos celulares, proceso que involucra generar una lisis celular, separar y purificar los ácidos nucleicos del resto de componentes de la célula (azúcares, proteínas, lípidos y glúcidos) (Foto 9.2.). Para la extracción de ADN hay que tener en cuenta que el protocolo a emplear debe ser acorde al tipo de microorganismo que se analizará. En la actualidad existen protocolos estándares, o kits comerciales, en los cuales el proveedor facilita la metodología de trabajo.

Uno de los protocolos estándares más utilizados es el método de extracción con bromuro de hexadeciltrimetilamonio, reactivo conocido por su sigla en inglés como CTAB, el cual permite extraer ADN a partir de bacterias y hongos (Foto 9.2.). Como alternativa al uso de CTAB existen protocolos que emplean reactivos para la preparación de soluciones buffer de lisis como el

dodecilsulfato sódico (SDS), *N*-lauroilsarcosina, triton X-100, entre otros. Con el ADN genómico extraído desde el microorganismo, es posible realizar una tipificación de éste y una secuenciación de ciertos genes marcadores para una correcta identificación.

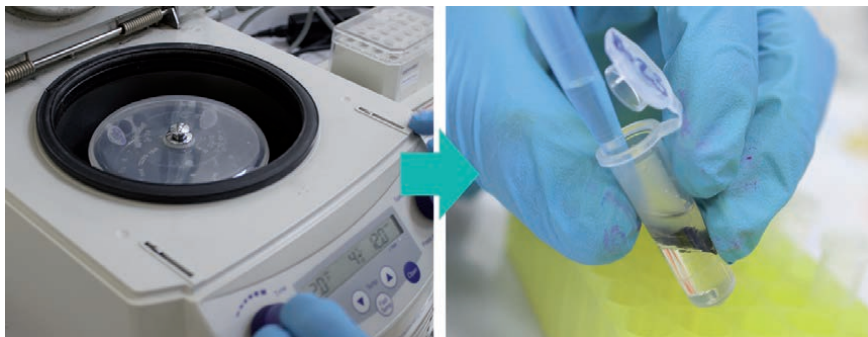


Foto 9.2. Proceso de extracción de ADN de cepas fúngicas empleando como solución de lisis CTAB 2%. Centrifugación de inóculo microbiano con solución de lisis y cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y extracción de sobrenadante.

9.3.3. Etapa 3. Tipificación molecular de microorganismos

La tipificación de microorganismos es una técnica complementaria a la secuenciación de genes que se utiliza para amplificar regiones aleatorias del genoma microbiano o de tamaño definido, para la obtención de un patrón de bandas visualizado por electroforesis. Con este patrón es posible detectar y diferenciar cepas o identificar clones dentro de un grupo de microorganismos aislados. Técnicas de tipificación empleadas en la actualidad para el estudio de microorganismos destacan los elementos intergénicos de consenso repetitivos de enterobacterias (ERIC-PCR) y elementos extragénicos palindrómicos (REP-PCR), BOX-PCR y GTCs-PCR.

9.3.4. Etapa 4. Amplificación de secuencias nucleotídicas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica enzimática empleada para amplificar ADN de una región determinada. Para su realización se necesitan como componentes: ADN genómico del microorganismo; cebadores u oligonucleótidos de ADN que

corresponden a secuencias cortas de ADN que se emplean para hibridar con el ADN de la muestra; enzima ADN polimerasa para sintetizar ADN a partir de una hebra molde; desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), que corresponden a los bloques de construcción que emplea la enzima para sintetizar la hebra de ADN complementaria; una solución amortiguadora; $MgCl_2$ como cofactor de la ADN polimerasa y agua desionizada estéril.

Al momento de realizar una PCR, se recomienda trabajar en condiciones asépticas para evitar cualquier tipo de contaminación, mantener las muestras y los reactivos a bajas temperaturas, ya sea empleando una caja de poliestireno expandido u otro material aislante, con hielo o una gradilla congelada. Siempre utilizar tubo de PCR estériles y rotularlos antes de realizar la reacción. Preparar una solución con la mezcla de reactivos para llevar a cabo la amplificación, tales como agua, soluciones amortiguadoras, dNTPs, cebadores, $MgCl_2$, etc. Agregar el ADN de las muestras problema en su correspondiente tubo de PCR y dispensar proporcionalmente la solución con la mezcla en cada tubo de PCR (Foto 9.3.A.).

Un termociclador es la máquina encargada de subir y bajar la temperatura durante la PCR, y que permite llevar a cabo los ciclos de amplificación de la molécula de ADN. La PCR se compone de tres fases: (i) desnaturalización, que consiste en la separación de las hebras de ADN a temperaturas entre 94 y 96 °C; (ii) hibridación, que consiste en la unión de los cebadores a la secuencia de ADN de una hebra a temperaturas entre 40 y 60 °C; (iii) elongación, que consiste en la síntesis de la cadena complementaria de ADN realizada por la enzima ADN polimerasa a una temperatura de 72 °C. Antes de comenzar la PCR, se debe tener cargado el programa de PCR en el termociclador (Foto 9.3.B.) y, finalmente, colocar los tubos de PCR en los pocillos correspondientes dentro del termociclador. Siempre verificar que la tapa de los tubos de PCR estén bien cerrados (Foto 9.3.C.).

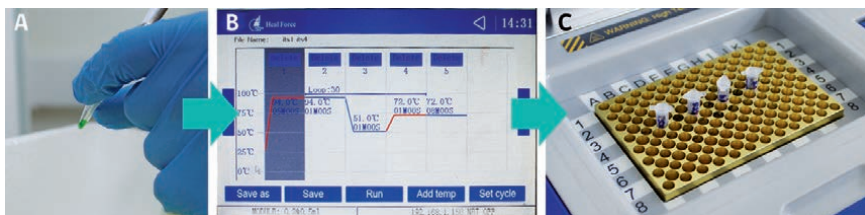


Foto 9.3. Realización de una PCR. (A) Preparación de muestra con solución mezcla; (B) ejemplo de programa de PCR programado en un termociclador; (C) tubos de PCR montados en el termociclador antes de iniciarse el proceso de PCR.

9.3.5. Etapa 5. Electroforesis de los productos de PCR

La electroforesis es una técnica que consiste en separar partículas con carga, en este caso fragmentos de ADN, cuando son sometidas a un campo eléctrico. Para esto, se utiliza una matriz de agarosa (generalmente entre 0,8 y 1,5%) en una solución amortiguadora, además de una tinción que se intercala en el ADN para permitir su visualización. A dicha matriz se le aplica un flujo de electricidad suministrado por una fuente de poder, en la cual se establece el voltaje y tiempo en que se aplica el campo eléctrico. La migración de los fragmentos de ADN que poseen carga negativa, se produce hacia el electrodo positivo, ubicado en el otro extremo de la cámara.

Finalizada la migración de los fragmentos, las bandas de ADN se pueden visualizar en el gel aplicando luz ultravioleta (UV) con un transiluminador. Es recomendable fotodocumentar el resultado con una cámara fotográfica adosada al transiluminador UV. En el proceso de identificación molecular, la electroforesis es utilizada, en primera instancia, para evaluar la integridad del ADN extraído desde la colonia microbiana y, en segunda instancia, para corroborar la amplificación de ADN mediante PCR.

La preparación de un gel de agarosa a 1% se realiza en una solución de tris(hidroximetil)aminometano (tris), acetato y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1x. Para que la agarosa se disuelva en la solución, debe ser calentada en un microondas. Verifique, constantemente, que la solución se vea transparente y sin restos de agarosa por disolver. Dispensar la agarosa en el molde, el cual previamente fue acomodado con un peine para formar los pocillos en donde se cargará la muestra. Dejar solidificando alrededor de unos 15 minutos, para luego retirar el gel del molde e ingresarlo en la cámara de electroforesis, la cual fue previamente llenada con una solución de sales, y luego retirar el peine.

El producto de PCR se debe mezclar con una solución de carga que se debe dispensar con una micropipeta en un pocillo del gel. Configurar el tiempo y voltaje a utilizar en la fuente de poder y dejar que la muestra migre dentro del gel durante un tiempo de aproximadamente 1 hora. Finalizada la migración del ADN, revisar en un transiluminador y fotodocumentar el resultado obtenido (Foto 9.4.).

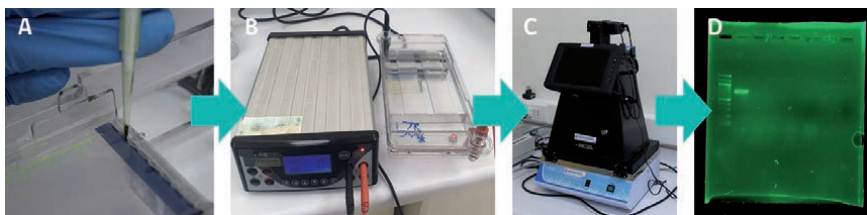


Foto 9.4. Electroforesis de productos de PCR en un gel de agarosa. (A) Carga de amplicones obtenidos después de la PCR en los pocillos de un gel de agarosa; (B) migración de los productos de PCR en un sistema de electroforesis; (C) documentación por fotografía digital de un gel de agarosa con productos de PCR; (D) visualización de amplicones de PCR en un gel de agarosa.

9.3.6. Etapa 6. Metodología para la secuenciación de genes

Una vez verificado que el tamaño de banda visualizado en el gel de agarosa coincide con el esperado, se procede a la secuenciación de la muestra de ADN. Este proceso consiste en determinar el orden de las bases nucleotídicas (adenina A, guanina G, citosina C y tiamina T) en una molécula de ADN que, en este caso, corresponde a la secuencia del gen amplificado mediante PCR y que nos permitirá conocer la afiliación taxonómica del microorganismo en estudio. Siempre se debe secuenciar en ambas direcciones con cebadores sentido (*forward*) y anti-sentido (*reverse*).

Este tipo de análisis ha evolucionado durante estos últimos años. En la actualidad existen distintas tecnologías de secuenciación (Cuadro 9.5.), con una notoria disminución en el costo, en comparación con años anteriores. Para la secuenciación de genes discretos se utiliza el método de Sanger, sin embargo, es importante mencionar que para secuenciar genomas completos existen las técnicas de secuenciación como Illumina, Pacific Biosciences SMRT y Oxford Nanopore que permiten obtener más información para elucidar la afiliación taxonómica del microorganismo.

Para la secuenciación de los genes amplificados, la CChRGM utiliza el método Sanger. Los amplicones verificados por electroforesis son enviados junto con los cebadores, dentro de una caja de poliestireno expandido para mantener una temperatura estable en las muestras durante el proceso de transporte.

Cuadro 9.5. Tecnologías de secuenciación utilizadas en la actualidad*.

Tecnología	Tamaño lectura	Tasa de error (%)	Rendimiento (GB/corrida)
Illumina	100 - 200 pb	0.1	200 - 600
Pacific Biosciences SMRT	10 - 100 kb	5-15	10 - 20
Oxford Nanopore MinION	Variable (sobre los 1.000 kb)	5-20	5 - 10
ABI Sanger	400 - 900 pb	0.3	0.00069 - 0.0021

*Información extraída de Kchouk et al. (2017).

9.3.7. Etapa 7. Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas secuenciadas

La bioinformática como disciplina busca dilucidar las correlaciones, estructuras y patrones obtenidos a partir de información biológica. Con las herramientas que dispone la bioinformática, se puede efectuar la depuración, alineamiento y comparación de una secuencia nucleotídica problema contra una base de datos de secuencias de especies microbianas conocidas ya depuradas. Con esto se puede contrastar y construir relaciones evolutivas por comparación de una secuencia nucleotídica pequeña, varias regiones del ADN o incluso del genoma completo de un microorganismo.

Para el procesamiento de secuencias existen distintas alternativas de programas computacionales, algunos son de libre acceso y otros requieren de un pago para adquirir la licencia de uso (Cuadro 9.6.).

Cuadro 9.6. Programas empleados para el análisis de secuencias de ADN.

Nombre Programa	Tipo de licencia	Función
Sequencher	Pagada	Depurar y ensamblar secuencias complementarias.
Geneious	Pagada	Depurar, ensamblar secuencias complementarias. Confección de alineamientos y árboles filogenéticos.
Chromas	Pagada	Depurar y ensamblar secuencias complementarias.
Staden Packge	Libre acceso	Depurar y ensamblar secuencias complementarias.
Prinseq	Libre acceso	Procesamiento de secuencias que conforman un genoma.
SPAdes	Libre acceso	Ensamble de genomas.

En la CChRGM se utilizan varios programas para el procesamiento de secuencias nucleotídicas, uno de ellos es de libre acceso y se llama Staden Package (Figura 9.2.). Para su utilización se debe descargar desde el sitio web (<http://staden.sourceforge.net>) e instalar los programas PreGap y Gap4, los cuales se utilizan para alinear las secuencias complementarias de ADN obtenidas de secuenciación (por lo general con extensión *.ab1). En el programa PreGap se deben cargar las secuencias obtenidas de secuenciación (Figura 9.2.A.). Luego, establecer los parámetros para el alineamiento de las secuencias complementarias en *"Configure Modules"* marcar las opciones *"Initialise Experiment Files"*, *"Quality clip"* y *"Gap4 shotgun assembly"*. En la opción *"Gap4 shotgun assembly"* asignar un nombre a la base de datos (se sugiere usar la extensión *.db) y dejar activa la opción *"create new database"* y activar la opción *"Run"* para la creación de un archivo con la base de datos (Figura 9.2.B.).

Luego, abrir el programa Gap4 y cargar el archivo de base de datos generado con la extensión *.db que tiene como ubicación la carpeta donde se encuentran las secuencias complementarias que fueron alineadas. Clickear con el botón secundario del ratón sobre la línea negra que aparece en la ventana *"contig selector"* e ir a la opción *"edit contig"* (Figura 9.2.C.). De esta manera se accede a visualizar el electroferograma correspondiente a las secuencias individuales y el resultado representado en la secuencia consenso (Figura 9.2.D.). Para finalizar, dirigirse a *"file"*, *"Save consensus"* y establecer que el archivo sea guardado en formato fasta, usando la extensión *.fasta.

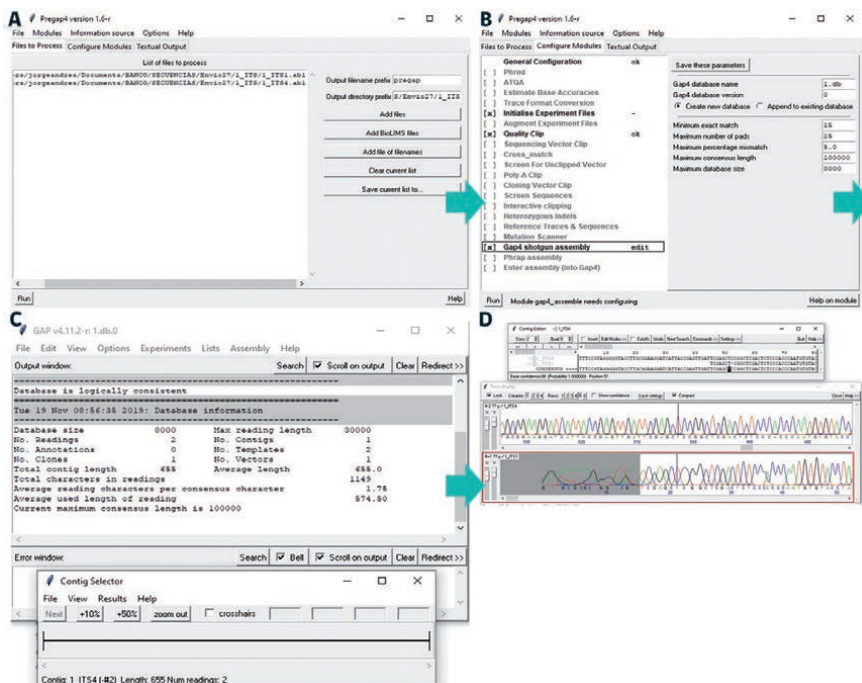


Figura 9.2. Uso del programa Staden Package para la obtención de una secuencia consenso, usando secuencias complementarias obtenidas de la secuenciación de un gen. (A) Programa PreGap para alinear secuencias complementarias; (B) configuración de PreGap para ensamblaje de las secuencias complementarias; (C) resultado de la obtención de una secuencia consenso a través del programa Gap4; (D) visualización de la secuencia consenso final y el electroferograma asociado a las secuencias complementarias usadas para la obtención de la secuencia consenso en el programa Gap4.

Antes de realizar el ensamblaje de las secuencias obtenidas de la secuenciación de un amplicón de ADN, se debe revisar la calidad de éstas. Para ello, es necesario visualizar los electroferogramas resultantes de manera individual y verificar que cada base nucleotídica, representada por un pico cromatográfico, esté bien definida, lo cual es indicativo de una buena calidad de secuenciación (Figura 9.3.A.); normalmente, tanto los primeros como los últimos 30 a 40 nucleótidos no están bien definidos y no son considerados en la secuencia consenso. Por otro lado, cuando existe un excesivo solapamiento de los picos cromatográficos o presencia de lugares vacíos, la calidad de la secuenciación no es óptima y, por ende, afectaría el ensamblaje de las secuencias

complementarias (Figura 9.3.B.). Las secuencias de mala calidad deben ser rechazadas y se debe considerar realizar una nueva secuenciación, para lo cual se puede contactar al proveedor del servicio y solicitar que se repita la secuenciación o enviar un nuevo amplicón de ADN para dichos fines.

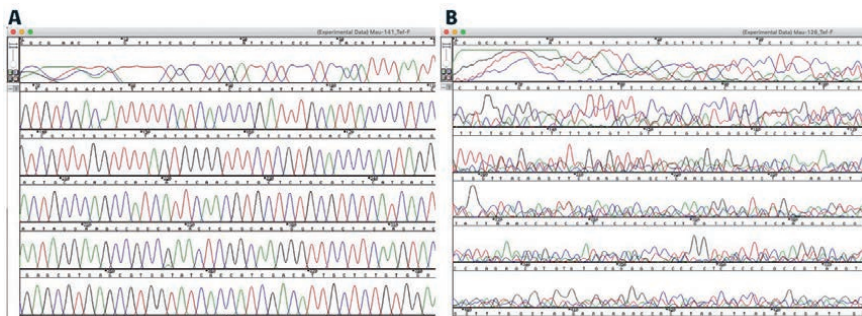


Figura 9.3. Calidad de la secuencia de un amplicón de ADN visualizado en un electroferograma. (A) Secuenciación de calidad adecuada; (B) secuenciación de calidad inadecuada. Electroferogramas visualizados con programa Sequencer versión 5.4.6.

9.4. Metodología para análisis de filogenia

Finalmente, para poder concluir la afiliación filogenética de un microorganismo problema, se requiere utilizar una serie de estrategias bioinformáticas, las cuales se detallan en las siguientes tres etapas:

9.4.1. Etapa 1. Selección de bases de datos de secuencias nucleotídicas para la identificación de un microorganismo

Posterior al ensamblaje de las secuencias obtenidas de la secuenciación, se procede a la comparación de esta secuencia consenso contra una base de datos de secuencias de genes de microorganismos conocidos (Cuadro 9.7.). Existen varias bases de datos disponibles en la web. Algunas son exclusivas para uso de secuencias de bacterias y otras para hongos y levaduras. Estas bases de datos poseen algoritmos que permiten la comparación de la secuencia problema contra todas las secuencias depositadas en esa base de datos, entregando como resultado una secuencia que es más similar a la secuencia problema. Como resultado de este análisis, se obtiene una noción del género microbiano

al que podría pertenecer el microorganismo bajo estudio. Generalmente, se requiere realizar el análisis filogenético con más de un gen para poder discriminar entre microorganismos con un alto grado de similitud.

Cuadro 9.7. Bases de datos que proveen información y herramientas de análisis para la identificación de microorganismos.

Nombre de la base de datos	Utilidad	Enlace
BLAST	Identificación molecular de microorganismos	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
EMBL	Identificación molecular de microorganismos	https://www.ebi.ac.uk/
CNGBdb	Identificación molecular de microorganismos	https://db.cngb.org/
EzBioCloud	Identificación molecular bacterias	https://www.ezbiocloud.net/identify
Bac Dive	Información de clasificación taxonómica, fisiología, cultivo y origen	https://bacdiver.dsmz.de/
YeastIP	Identificación de molecular de levaduras	http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/
TrichOKEY	Identificación molecular y morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.	http://www.isth.info/tools/molkey/
Mycobank	Identificación de hongos	http://www.mycobank.org/

Un ejemplo de base de datos de secuencias nucleotídicas es GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank es una base de datos de acceso libre que mantiene una colección de acceso público de secuencias nucleotídicas y de traducción de proteínas anotadas y curadas, la cual está enlazada a una herramienta llamada *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que está disponible en internet (Cuadro 9.8.). BLAST busca regiones de similitud entre secuencias biológicas, comparando una secuencia nucleotídica (o de proteínas) problema contra secuencias disponibles en GenBank y se calcula la significancia estadística de esta similitud.

Para llevar esto a cabo, se debe acceder al sitio web de BLAST (Figura 9.4.A.), pegar la secuencia de ADN del microorganismo que se quiera identificar en la caja de ingreso de secuencia y seleccionar una de las bases de datos que sea atinente al tipo de microorganismo por analizar (por ejemplo, bacteria u hongo) (Figura 9.4.B.). Finalmente, presionar el botón "BLAST" para obtener las secuencias con mayor grado de similitud a la secuencia problema (Figura 9.4.C.).

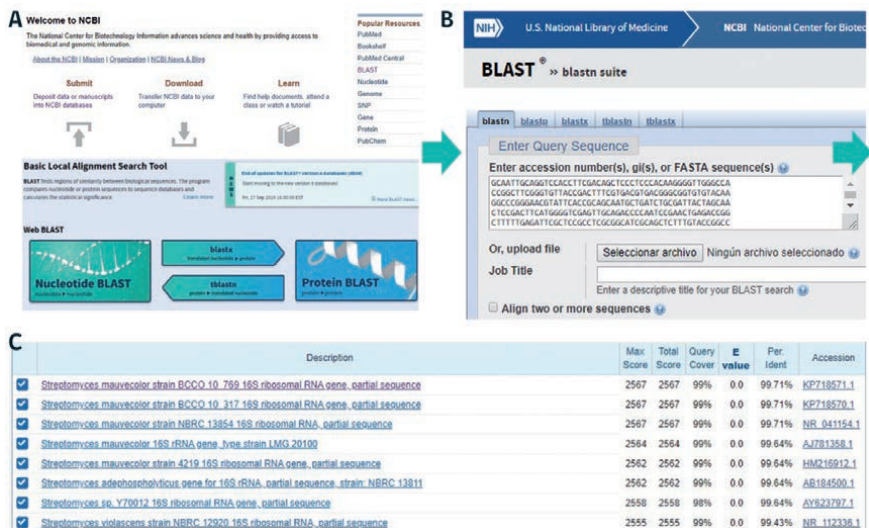


Figura 9.4. Herramienta BLAST disponible en NCBI para determinar secuencias con mayor porcentaje de similitud respecto del microorganismo en estudio. (A) Acceso a la herramienta BLAST y las alternativas de análisis disponibles; (B) panel de configuración para ingresar la secuencia que se pretende analizar en BLAST y parámetros de análisis; (C) resultado de un BLAST con las secuencias con mayor porcentaje de similitud a la secuencia problema.

9.4.2. Etapa 2. Selección de herramientas bioinformáticas para el análisis filogenético

El análisis filogenético es un método que busca elucidar la historia evolutiva y parentesco entre un grupo de organismos. Para ello, hoy en día se emplea información molecular procedente de secuencias de DNA o de proteínas. Este tipo de análisis se lleva a cabo con programas o herramientas disponibles en la web para la confección de un alineamiento de secuencias y posterior construcción de un árbol filogenético. Con estos programas, tales como MUSCLE, Clustal Omega, entre otros, es posible fijar el método de alineamiento de secuencias nucleotídicas, el algoritmo de construcción de árbol filogenético (unión de vecinos más cercanos, máxima parsimonia, máxima verosimilitud, bayesiano, entre otros) y el método de soporte (Bremer, *bootstrap*, ALRT, entre otros). Algunos de los programas para dichos análisis son de acceso libre y otros de pago (Cuadro 9.8.). A su vez, existen servidores web que entregan el servicio de análisis de filogenia de forma gratuita (Cuadro 9.9.).

Cuadro 9.8. Programas empleados para el análisis filogenético.

Nombre Programa	Tipo de licencia	Función
Mega	Libre acceso	Realizar alineamientos y construcción árboles de filogenia.
Geneious	Pagada	Realizar alineamientos y construcción árboles de filogenia.
Clustal Omega	Libre acceso	Realizar alineamientos.
MAFT	Libre acceso	Realizar alineamientos.
MUSCLE	Libre acceso	Realizar alineamientos.
MEGA	Libre acceso	Realizar alineamientos y construcción árboles de filogenia.
Mezquite	Libre acceso	Concatenar secuencias para el análisis filogenético.
RAxML	Libre acceso	Construcción de árboles de filogenia.

Cuadro 9.9. Sitios web que disponen de herramientas para el desarrollo de análisis filogenéticos.

Nombre de la herramienta	Enlace
Genome-to-Genome distance calculator (Single-Gene Trees)	https://ggdc.dsmz.de/
Phylogeny.fr	http://www.phylogeny.fr/index.cgi

9.4.3. Etapa 3. Selección de metodología para la realización de un análisis filogenético

Para ejemplificar un análisis filogenético mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se ha utilizado la secuencia nucleotídica de la región intergénica Bloc de una cepa de *Beauveria* sp. (denominada MAU-17). Como primer paso, se deben descargar las secuencias nucleotídicas de las regiones antes mencionadas desde una base de datos, procurando, preferentemente, emplear secuencias reportadas en una publicación y/o secuencias de cepas tipo, de manera de obtener un resultado de filogenia confiable y certero. Se debe generar un archivo de texto con extensión *.fasta (o *.txt), y guardar las secuencias del microorganismo desconocido. En otro archivo *.fasta, incorporar las secuencias nucleotídicas de referencia para la región de ADN de interés, en este caso la misma región amplificada para la cepa problema. A continuación, ingresar al sitio web de *Genome-to-Genome Distance Calculator* (Figura 9.5.) e ir a la opción *Single-Gene Trees* para la realización de un análisis filogenético (Figura 9.5.). A partir de este análisis se puede identificar que la cepa MAU-17 está emparentada con *Beauveria bassiana*.

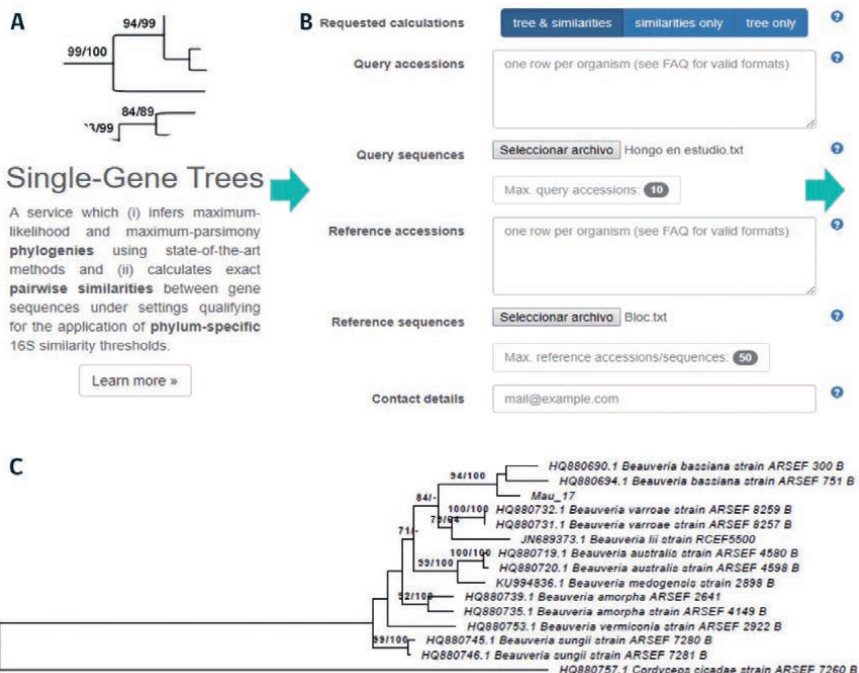


Figura 9.5. Uso de la plataforma *Genome-to-Genome Distance Calculator* de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) para la confección de un análisis filogenético. (A) Opción presente en el panel de inicio para la confección de un análisis filogenético; (B) incorporación de la o las secuencias problema y las secuencias de referencia; (C) resultado obtenido del análisis filogenético representado por un cladograma.

9.5. Depósito de una secuencia de ADN en una base de datos

Una vez que se ha realizado la identificación de un microorganismo por medio de la secuenciación de una porción de su ADN y mediante análisis de filogenia, existe la posibilidad de ingresar dicha secuencia a una base de datos. El objetivo de incorporar una secuencia de ADN a una base de datos es, primero, la validación de la calidad de esa secuencia por un comité que administra la base de datos. Segundo, la obtención de un código para esa secuencia, el cual puede ser empleado en publicaciones científicas y, tercero, hacer disponible la secuencia al resto de la comunidad científica.

9.5.1. Metodología para ingresar una secuencia a una base de datos

La base de datos GenBank de NCBI permite el depósito de una o más secuencias, para lo cual es necesario registrarse como usuario. De esta manera es posible acceder a las opciones disponibles en la plataforma por medio de la opción “*submit*”, luego seleccionar la opción acorde al tipo de secuencia o genoma que se desea subir (Figura 9.6.).

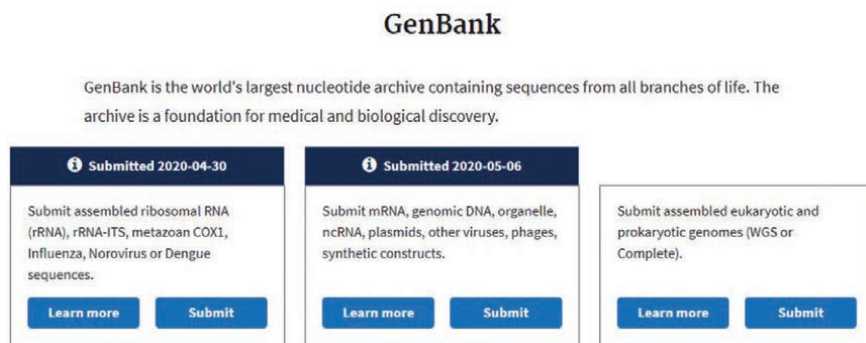


Figura 9.6. Ingreso de secuencias de ADN por la plataforma disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se muestra la página inicial y las categorías para el ingreso de secuencias a la base de datos.

Una vez que se ha completado la información del o los autores responsables de la secuencia, fecha para la liberación de la secuencia, nombre de la publicación donde se ha usado la secuencia de ADN, información de la muestra que procede la secuencia y la secuencia nucleotídica en formato fasta, el curador/administrador de la base de datos de GenBank informará al autor responsable si el proceso fue finalizado correctamente. En el caso de haber sido un proceso correcto, la secuencia y su respectiva información estarán disponibles para acceso público en la base de datos (Figura 9.7.).

Serratia sp. strain RGM2525 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH332648.2

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#) 

LOCUS MH332648 1388 bp DNA linear BCT 23-JUL-2019
DEFINITION Serratia sp. strain RGM2525 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION MH332648
VERSION MH332648.2
KEYWORDS .
SOURCE Serratia sp.
ORGANISM [Serratia sp.](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
Yersiniaceae; Serratia.

Figura 9.7. Información de acceso público una vez que el curador/administrador de la base de datos GenBank haya aprobado el ingreso de la secuencia a la base de datos.

9.6. Literatura consultada

Albufera, U., Bhugaloo-Vial, P., Issack, M.I., Jaufeerally-Fakim, Y. (2009). Molecular characterization of Salmonella isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 322-327.

Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., & Ventosa, A. (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2436-2446.

Brondz, I., & Olsen, I. (1986). Microbial chemotaxonomy: Chromatography, electrophoresis and relevant profiling techniques. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 379, 367-411.

Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 324-325.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.

- Fujita, M., Hanaura, Y., & Amemura, A. (1995).** Analysis of the *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. *Gene*, 167(1-2), 93-98.
- Garrity G. (2005).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria. Verlag US: Springer.
- Garrity G., Boone D. R & Castenholz R. W. (2001).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Verlag New York: Springer.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., & O'donnell, K. (2004).** FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 473-479.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995).** Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006).** Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2), 477-486.
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017).** Generations of sequencing technologies: From first to next generation. *Biology and Medicine*, 9(3).
- Kepler, R. M., & Rehner, S. A. (2013).** Genome assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 210-217.
- Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B. P., Paster B. J., Staley J. T., Ward N., Brown D. & Parte A. (2010).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Verlag New York: Springer.
- Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. (2011).** The yeasts a taxonomic study, 5th ed. New York: Elsevier.

- Margolin, W., Bramhill, D., & Long, S. R. (1995).** The *dnaA* gene of *Rhizobium meliloti* lies within an unusual gene arrangement. *Journal of Bacteriology*, 177(10), 2892–2900.
- Mohapatra, B.R., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A., 2007.** Evaluation of repetitive extragenic palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals. *Microbiology and Immunology*, 51, 733–740.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005).** Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151(7), 2141–2150.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000).** A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78.
- O'Donnell, K. (1998).** Molecular genetic approaches for measuring microbial diversity: Examples from filamentous fungi. *National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki, Japan*.
- Okamoto, T., Maruyama, A., Imura, S., Takeyama, H., & Naganuma, T. (2004).** Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* gene sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 323–333.
- Onodera, Y., & Sato, K. (1999).** Molecular cloning of the *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacteroides fragilis* encoding DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(10), 2423–2429.
- Piontelli, E. (2015).** Manual de microhongos filamentosos. I. Viña del Mar: Universidad de Valparaíso.
- Ramadass, P., Latha, D., Senthilkumar, A., Srinivasan, P., Saranya, N., (2002).** Arbitrarily primed PCR – a rapid and simple method for typing of leptospiral serovars. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 20, 25–28.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011).** Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055–1073.

- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Actinobacteria. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Firmicutes and Tenericutes. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Gammaproteobacteria. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Prokaryotic Physiology and Biochemistry. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Rosenberg, E., DeLong E., Lory, S., Stackebrandt E. & Thompson, F. (2014).** The Prokaryotes Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Schaad N. W., Jones J. B. & Chun W. (2001).** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Edition. USA: APS Press, St. Paul, MN.
- Sutton, S. V., & Cundell, A. M. (2004).** Microbial identification in the pharmaceutical industry. In *Pharmacoepial Forum*, 30(5), 1884–1894.
- Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I., Swings, J., 2005.** Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. FEMS Microbiol. Lett. 247, 59–63.
- Ventura, M., Canchaya, C., Bernini, V., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E. & van Sinderen, D. (2005).** Genetic characterization of the *Bifidobacterium breve* UCC 2003 *hrcA* locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8998–9007.

Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. & Whitman W. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3: The Firmicutes. Verlag New York: Springer.

Wang, Y., & Jiang, Y. (2016). Chemotaxonomy of Actinobacteria. In Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. IntechOpen.

Weidner, S., Arnold, W., & Puhler, A. (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 766-771.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. I. & Parte A. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria. Verlag New York: Springer.

Wilson, L.A., Sharp, P.M., (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1156-1168.

Glosario

Accesión: muestra viva de un microorganismo mantenida en una colección de cultivos microbianos para su preservación y uso.

Aislamiento: proceso para separar un microorganismo desde su ambiente natural o desde una mezcla de microorganismos.

Amplicón: solución concentrada de moléculas de ADN idénticas, producidas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Autoridad internacional de depósito (IDA): colección de cultivo microbiano que se rige según las normas y reglamentos establecidos por el tratado de Budapest, para el reconocimiento internacional de un depósito microbiano para fines de patentamiento.

Cebador: secuencia nucleotídica de cadena simple y corta que se emplea en una reacción de PCR para hibridarse en el ADN de la muestra. Son usados de a pares para definir la región de ADN que será amplificada.

Colección de cultivos microbianos: entidad que tiene por objetivo preservar el material genético de microorganismos fuera de su lugar original (*ex situ*) por períodos prolongados, de forma pura y viable.

Colecta: recolección de muestras para el aislamiento de microorganismos.

Criopreservación: método de preservación de células, organelos, tejidos, microorganismos u otra construcción biológica a bajas temperaturas (por ejemplo, menores a -80°C).

Crioprotector: compuesto que protege a las células durante el proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo.

Curador: persona que está a cargo de la colección de cultivos microbianos. Se encarga de ordenar la colección, administrar los recursos y dirigir las actividades que se desarrollan en las instalaciones de una colección de material biológico.

Curatoría: labor que ejerce una persona para poner a disposición del público una colección microbiana. Involucra labores de administración y protección de una colección biológica, a través de la implementación y ejecución de protocolos específicos para cada actividad asignada.

Depósito de microorganismos: proceso de ingreso de un microorganismo en una colección de cultivos microbianos, el cual puede ser público o privado.

Descenso programado de temperatura: etapa dentro del proceso de criopreservación que involucra disminuir de manera controlada la temperatura de las muestras que se pretenden preservar.

Filogenia: parte de la biología que estudia las relaciones de afinidad y parentesco de los organismos, buscando dilucidar el origen y la historia evolutiva de los taxones.

Liofilización: método de deshidratación de una muestra líquida, a través de la extracción de solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a una presión reducida.

Lioprotector: sustancia o compuesto coadyuvante para estabilizar e impedir daños en las células durante el proceso de liofilización.

Osmolaridad: medida que permite representar la concentración de solutos en una solución, factor a considerar al momento de liofilizar y criopreservar microorganismos.

Pasaporte microbiano: documento sujeto a un formulario con información necesaria para que un microorganismo sea incorporado a una colección de cultivo. Por ejemplo, género y especie microbiana, nombre de la institución depositante, material o sustrato del que fue aislado, lugar y coordenadas geográficas, fecha de colecta, entre otras.

PCR: sigla proveniente del inglés para referirse a la amplificación en cadena de la polimerasa, metodología empleada en biología molecular para amplificar regiones de ADN.

Regeneración: método empleado para reactivar un cultivo microbiano preservado ya sea por criopreservación o liofilización.

Secuenciación de ADN: método empleado para determinar el orden de las cuatro bases nucleotídicas que conforman una molécula de ADN, el que se puede llevar a cabo con distintas tecnologías y estrategias, dependiendo del objetivo de investigación.

Sistema de gestión de calidad: conjunto de normas y estándares que se interrelacionan entre sí, para hacer cumplir los requisitos de calidad que una organización requiere para satisfacer los requerimientos acordados con sus clientes, a través de una mejora continua, de una manera ordenada y sistemática.

Sublimación: fenómeno físico que implica el cambio de estado de una sustancia de estado sólido a gaseoso y viceversa sin pasar por el estado líquido.

Tratado de Budapest: acuerdo impulsado por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) en 1977 que reconoce internacionalmente el depósito de microorganismos para fines ligados a procedimientos en materia de patentes.

Viabilidad: habilidad de un cultivo para crecer, dividirse y formar colonias en medios de cultivo.



Boletín INIA / N° 428
www.inia.cl

