

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS
BACTERIANAS DE TRABAJO UTILIZADAS EN UN LABORATORIO DE
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

Juan Manuel Pacheco Molina
Raúl Alejandro Serpas Tejada

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

DICIEMBRE 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

LICDA. ANABELL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

LICDA. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia Gonzales de Díaz

MSc. Amy Elieth Moran Rodriguez

DOCENTES DIRECTORES

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Mirna Lorena Sorto

Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar a Dios por permitirnos culminar nuestra carrera universitaria; a nuestros padres que nos apoyaron en todo momento desde nuestro nacimiento hasta la fecha y que con esfuerzo y sacrificio nos ven ahora convertidos en profesionales. A la Universidad de El Salvador y los profesionales que componen la planta docente de la facultad de Química y Farmacia por brindarnos los conocimientos básicos y necesarios para nuestro desempeño profesional en el ejercicio de nuestra vocación. A nuestros amigos que durante el transcurso de la carrera siempre estuvimos apoyándonos.

Extendemos nuestro agradecimiento a nuestros docentes directores por guiarnos con paciencia y empeño durante la elaboración de este documento y al cuerpo de Asesores de Area y Directora general de trabajos de graduación por brindarnos sus valiosas y objetivas observaciones durante las evaluaciones que vinieron a mejorar la entrega final del trabajo ahora presentado.

Juan Manuel Pacheco Molina

Raúl Alejandro Serpas Tejada

Dedicatoria

A Dios por mostrarme que con, mucha paciencia y sabiduría todo es posible. Además de permitirme vivir en este mundo en este momento.

A mis padres quienes con su esfuerzo y perseverancia lograron ayudarme a llegar a este momento, a mi familia que estuvo siempre conmigo apoyándome. Especialmente a los que me ven ahora desde el cielo: María Teresa Chacón, Marta Lidia Chacón, mi padre Manuel Pacheco y mi abuelo Gustavo Molina, que ahora ven uno de sus sueños cumplidos. A mi madre Norma Esthela Molina Velásquez y a mi tía Graciela Chacón Gómez por ser la inspiración a seguir esta profesión.

Agradezco a todas las personas que tocaron mi vida de una u otra manera, ayudándome a ser quien soy ahora, porque en cada uno de esos encuentros crecí un poco más. A mis amigos Raúl Serpas y Carmen López por estar en mis momentos de necesidad y por ser mis amigos.

Gracias a todos.

- Juan Pacheco

Dedicatoria

Le dedico este triunfo a Dios y María Auxiliadora por bendecirme cada día de mi vida y protegerme en todo camino que tomo, a mi mamá Ana Leticia Tejada de Serpas por darme la vida, educarme y brindarme su amor y apoyo para culminar mis estudios, a mi padre Raúl de Jesús Serpas, que en paz descansa por ser un modelo de cómo debe comportarse un hombre recto en la vida y porque sé que siempre está a mi lado frente a todos los desafíos que tomo, a mi abuela y tía Carmen Tejada y Mercedes Mejia, que con amor y ternura me cuidaron y aconsejaron durante mi infancia y mi vida adulta; a mi novia Diana Verónica Portillo Segovia, que me apoyo en cada momento de la realización de esta tesis y que con su amor me convierte en un mejor ser humano cada día. Agradecimientos especiales a mi compañero de tesis Juan Manual Pacheco porque juntos superamos las dificultades que implican la elaboración de un trabajo de investigación. A mis amigos Ana Turish, Michelle Quevedo, Gabriela Escobar, Marcelo Estrada, Erica y Tatiana Sandoval, Carmen López, Edgar Ardón y Ruth Araniva por brindarme la bendición de su amistad y su apoyo incondicional en todo momento muchas gracias.

Raúl Alejandro Serpas Tejada

INDICE

	Pag.
Resumen	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xix
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	24
3.1 Control de calidad	24
3.1.1 Apartados de la Normativa ISO 17025 segunda edición año 2005 pertinentes a la investigación	24
3.1.2 Apartados de la USP relacionados con el mantenimiento de cultivos Microbiológicos	25
3.1.3 Manejo de cultivos por lotes	26
3.2 Métodos de preservación de microorganismos	28
3.2.1 Conservación por congelación	29
3.2.2 Conservación por liofilización	31
3.2.3 L-drying	33
3.2.4 Conservación por transferencia periódica	34
3.2.5 Métodos restringidos	35
3.2.6 Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar Estéril	36

3.3 Caracterización de cultivos	37
3.3.1 Clasificación de los métodos de identificación microbiana	38
3.3.2 Métodos basados en criterios morfológicos.	38
3.3.3 Métodos basados en tinción diferencial	39
3.3.4 Pruebas bioquímicas	39
3.4 Control de calidad de cultivos	41
3.5 Estabilidad Bioquímica	43
3.6 Características de los microorganismos en estudio	43
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	47
4.1 Tipo de estudio	47
4.2 Investigación bibliográfica	47
4.3 Esquema general del procedimiento experimental	47
4.3.1 Preparación de suspensiones estandarizadas	48
4.3.2 Caracterización de los microorganismos	49
4.3.3 Conservación de los microorganismos	49
4.3.3.1 Método de L-drying	49
4.3.3.2 Método de conservación en agar BHI	50
4.3.4 Control de calidad de los microorganismos conservados	51
4.4 Partes con las que cuenta el manual de procedimientos	53
4.5 Análisis Estadístico	53
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	58

5.1 Caracterización inicial de las cepas	58
5.2 Conservación de las cepas	60
5.2.1 Conservación por el método de L-drying	61
5.2.2 Conservación por el método de siembra en agar BHI	61
5.3 Viabilidad y conservación de propiedades bioquímicas	62
5.3.1 Viabilidad de los microorganismos por L-drying	65
5.3.2 Viabilidad de los microorganismos por siembra en agar BHI	69
5.4 PUREZA DE MICROORGANISMOS	73
5.5 ESTABILIDAD BIOQUIMICA	76
5.6 Manual de conservación de cepa	78
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	104
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	106
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

Índice de Figuras

Figura N°

- 1 Esquema de manejo de cultivos de reserva por el método de cultivo por lotes pagina
- 2 Morfología macroscópica
- 3 Tinción diferencial de Gram
- 4 Sistema de Pruebas bioquímicas API
- 5 Metodología general de la investigación
- 6 Esquema de estandarización y verificación de viabilidad de cultivos Esquema general de dilución y conteo de los cultivos estandarizado
- 7 Sistema utilizado para la conservación de las bacterias por el Método
- 8 Procedimientos de reanimación para cultivos conservados por siembra en agar BHI y L-drying.
- 9 Esquema de dilución y conteo para cultivos conservados por L-drying
- 10 Esquema de dilución y conteo para cultivos conservados por siembra en agar BHI
- 11 Resultados del sistema de identificación Digital Rapid ONE para ***Salmonella cholerae*** serovar: ***typhimurium***
- 12 Resultados del sistema de identificación Digital Rapid ONE para ***E. coli***.
- 13 Viales con bacterias conservadas por L-drying (Izquierda) y siembra en agar BHI (Derecha)
- 14 Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por el método L-drying (Izquierda) y el método de BHI (derecha).
- 15 Grafica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: método, tiempo microorganismo).
- 16 Homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: método, tiempo microorganismo).

- 17 Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por L-drying
- 18 Homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA (Metodo: L-drying Factores: tiempo microorganismo).
- 19 Grafica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA (Metodo: L-drying; Factores: método, tiempo microorganismo).
- 20 Viabilidad residual de los microorganismos conservados por el método de L-Drying
- 21 Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por siembra
- 22 Evaluación de homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA al método BHI(Factores: tiempo microorganismo).
- 23 Grafica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA al método BHI (Factores: tiempo microorganismo).
- 24 Viabilidad residual de los microorganismos conservados por el método de siembra en agar BHI. La línea azul indica los datos obtenidos experimentalmente, y la línea roja indica la línea de tendencia agregada mediante el programa Excel® cuya ecuación y coeficiente de correlación se indican dentro de cada gráfica.
- 25 Certificados de Identidad de la cepa de ***E. coli*** utilizada.
- 26 Certificados de Identidad de la cepa de ***P. aeruginosa*** utilizada.
- 27 Certificados de Identidad de la cepa de ***Salmonella*** utilizada.
- 28 Certificados de Identidad de la cepa de ***St. aureus*** utilizada.
- 29 Gráfico de control de temperatura Septiembre-Diciembre 2012 dentro del área de cabina de Flujo laminar del laboratorio de microbiología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador

INDICE DE TABLAS

Tabla N°

- 1 Tiempo de almacenamiento, ventajas y desventajas de los diferentes métodos de conservación de mediano a largo plazo de microorganismos más utilizados
- 2 Métodos de caracterización de microorganismos
- 3 Características a evaluar en los cultivos para la determinar la variabilidad de los cultivos
- 4 Características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio
- 5 Pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos en estudio
- 6 Resultados esperados de verificación de la pureza de los cultivos conservados.
- 7 Resultados iniciales de las pruebas bioquímicas realizadas a ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538
- 8 Resultados iniciales de las pruebas bioquímicas realizadas a ***Pseudomona aeruginosa*** ATCC 9027
- 9 Análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo, tiempo y Método para un nivel de confianza de 95%
- 10 Datos de análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo y tiempo a un nivel de confianza de 95% para el método de conservación por L-Drying.
- 11 Resultados de la prueba LSD aplicada la viabilidad de los microorganismos conservados por el método L-Drying.
- 12 Humedad relativa de los tubos correspondientes a los diferentes microorganismos conservados por el método de L-Drying

- 13 Datos de análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo y tiempo a un nivel de confianza de 95% para el método de conservación por siembra en agar BHI.
- 14 Resultados de la prueba LSD aplicada la viabilidad de los microorganismos conservados por el método de conservación por siembra en agar BHI.
- 15 Predicción del tiempo de la vida útil de los microorganismos conservados por el método de BHI
- 16 Resultados de los controles de pureza microscópica para las bacterias en estudio.
- 17 Resultados de bacterias en estudio respecto a la morfología macroscópica esperada en medios de promoción y selectivos.
- 18 Porcentaje de identificación para ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 y ***Escherichia coli*** ATCC 8739 en la prueba RapidOne 20E
- 19 Resultados de pruebas bioquímicas IMVIC ***Escherichia coli*** 8739 por los métodos L-drying y BHI (**TSI**: Agar tres azúcares y hierro; **I**: Indol; **RM**: Rojo de Metilo.**VP**; Voges Proskauer; **C**: Citrato; **M**: Movilidad).
- 20 Resultados de pruebas bioquímicas IMVIC para ***Salmonella*** por los métodos L-drying y BHI (**TSI**: Agar tres azúcares y hierro; **I**: Indol; **RM**: Rojo de Metilo.**VP**; Voges Proskauer; **C**: Citrato; **M**: Movilidad).
- 21 Resultados de pruebas bioquímicas ***Staphylococcus aureus*** 6538 por método L-drying y BHI
- 22 Resultados de pruebas bioquímicas ***Pseudomona aeruginosa*** 9027 por método L-drying y BHI.
- 23 Tabla de distribución F
- 24 Cuadro resumen de ecuaciones necesarias para el análisis anova de 3 factores.

- 25 Cuadro de registro de temperaturas durante el último trimestre 2012
- 26 Promedios de los conteos realizados a los cultivos conservados por L-Drying.
- 27 Promedios de los conteos realizados a los cultivos conservados en agar BHI.

INDICE DE ABREVIATURAS

- ONPG (orto-nitrofenil-galactopiranosido): determina la presencia de la enzima beta-galactosidasa, que hidroliza el ONPG (incoloro) y produce ortonitrofenol (amarillo)
- ADH (arginina dihidrolasa): Transforma la arginina en ornitina, amonio y dióxido de carbono.
- LDC (lisina descarboxilasa) Descarboxila la lisina para formar cadaverina.
- ODC (ornitina descarboxilasa); Descarboxila la ornitina para formar putrescina.
- CIT (citrato): Determina la capacidad de utilizarlo como única fuente de carbono, en cuyo caso se elevará el pH del medio de cultivo y hace virar el indicador (azul de bromotimol) de verde a azul.
- H₂S (sulfuro de hidrógeno): Evalúa la producción de sulfuro de hidrógeno, a partir del tiosulfato que precipita con las sales de hierro incorporadas en el medio de cultivo.
- URE (urea): Determina la presencia de la ureasa mediante la producción de amonio a partir de la urea, con la consiguiente elevación del pH y viraje del indicador (rojo de fenol) de amarillo a rojo.
- TDA (triptófano desaminasa): Desamina el triptófano para formar ácido indol pirúvico y este forma un complejo de color café rojizo en presencia del reactivo cloruro férrico.
- IND (indol): Detecta la producción de indol a partir del triptófano; el indol forma un complejo de color fucsia en presencia del reactivo de Kovacs.
- VP (voges proskauer): Utiliza piruvato de sodio para la producción de acetoína, lo que acorta el tiempo de lectura, con respecto a la utilización de glucosa como sustrato. La acetoína se oxida a diacetilo

que es de color rojo, con los reactivos KOH y alfa naftol. El medio tiene incorporado creatina que intensifica el color rojo.

- GEL (gelatina): Determina la presencia de enzimas proteolíticas, en cuyo caso el pigmento negro que tiene incorporado el medio de gelatina difunde a través de todo el microtubo.
- GLU (glucosa), MAN(manosa), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (ramnosa), SAC (sacarosa), MEL (melibiosa), AMY (amigdalina), ARA (arabinosa): Determinan la producción de ácidos a partir de estos carbohidratos, lo que se evidencia por el viraje del indicador (azul de bromotimol) de azul a amarillo.
- ATCC: American type culture collection, corresponde a una colección de cultivos tipo con características morfológicas y bioquímicas conocidas, utilizadas como material de referencia en ensayos microbiológicos.
- PCR: Polimerase Chain Reaction, es un método utilizado para la amplificación de material genético que luego puede servir para otros propósitos como la identificación u otros análisis.
- ADN: Acido desoxirribonucleico, uno de los bloques de construcción del material genético, es un carbohidrato.
- BHI (Brain Heart Infusion): Infusion cerebro corazón.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron dos métodos de conservación de cepas bacterianas: agar BHI y L-Drying. La cual se realizó en los laboratorios de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador durante el último trimestre del 2012, utilizando las cepas: ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538, ***Pseudomona aeruginosa*** ATCC 9027, ***Escherichia coli*** ATCC 8739 y ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028 obtenidas de un primer pase.

Se evaluaron las características morfológicas, bioquímicas, y la viabilidad de los cultivos; en cuatro intervalos de tiempo: Antes de la conservación, después, a 1.5 meses y 3 meses después de conservados. Los resultados mostraron que para ambos métodos se lograron mantener la estabilidad bioquímica y morfológica de los cultivos durante el estudio. Para analizar los resultados de los conteos de viabilidad se utilizó ANOVA multifactorial, tomando en cuenta los factores: tiempo, método y microorganismo. Los resultados mostraron una diferencia significativa respecto a los conteos en métodos empleados. Luego se analizaron los datos de conteo por separado respecto a los factores tiempo y microorganismo, obteniendo valores $P=0.000$, $\alpha=0.05$, indicando diferencias significativas para ambos métodos, respecto a los dos factores. Finalmente las gráficas mostraron un aumento en los recuentos por L-drying, debido a un exceso de humedad causado por la desviación de la presión del sistema durante el procedimiento de conservación, que podría afectar la estabilidad bioquímica de los microorganismos conservados. Por otro, lado la conservación en agar BHI mostro un decrecimiento gradual en la viabilidad teniendo en consecuencia una menor variabilidad bioquímica. Mediante proyecciones se estimo un tiempo útil entre 4.8-5.6 meses. Finalmente se elaboró un manual de procedimientos con la información recolectada.

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.0 Introducción

Durante la realización de análisis de control de calidad es necesario contar con material de referencia que permita la calibración de equipos, la evaluación de un método o la atribución de valores a estos materiales. En el caso específico de un laboratorio de control de calidad microbiológico, el material de referencia consiste en cultivos puros de microorganismos específicos, por ejemplo: Cepas de colecciones de referencia, y cepas de trabajo (cultivos de alta estabilidad genética que han sido subcultivados a partir de una cepa de referencia). Es también necesario contar con un inventario de cepas de reserva, es decir cepas que provengan de un único repique de las cepas de referencia y que se encuentren adecuadamente conservadas.

Para la conservación de los microorganismos de referencia, los métodos utilizados deben garantizar que la cepa preservada mantenga sus características tanto fenotípicas, rasgos morfológicos que definen al organismo como tal, como genotípicas, características bioquímicas relacionadas con la identidad de la cepa. Estudios similares han sido llevados a cabo ya en la Universidad de El Salvador como los realizados por Benítez A y Hernández R sobre otros métodos de conservación de cepas de microorganismos, La implementación satisfactoria de estos métodos y su ejecución efectiva contribuye con la implementación de un sistema de gestión de calidad, convirtiéndose en una herramienta que permitiría el aseguramiento de la calidad mediante el seguimiento de directrices sobre elementos específicos de los procesos. De ahí la necesidad de los microorganismos de referencia para garantizar la calidad de los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en el control de calidad microbiológico en el laboratorio de microbiología de la Universidad de El Salvador.

El procedimiento comenzó con la obtención de las cepas de interés, las cuales serán proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, que proceden de un segundo pase de cepas ATCC. Una vez Obtenidos los cultivos se procederá a su resiembra, para su caracterización y preparación para ser conservados por el método de siembra en agar BHI y por L-drying, luego se realizaran controles a los cultivos conservados para verificar la constancia de sus características morfológicas, bioquímicas y la viabilidad en el último trimestre del año 2012. La información obtenida durante esta etapa de la investigación fue analizada utilizando el análisis de varianza multifactorial (ANOVA) tomando en cuenta los factores: método, tiempo y microorganismo; en el caso de las características bioquímicas se utilizaron tablas de contingencia para llevar un registro de los resultados de las caracterizaciones. Finalmente se redactó un manual para el mantenimiento de las cepas de referencia bacterianas dentro del laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO II
2.0 OBJETIVOS

2.0 Objetivos

1.1 Objetivo general:

1.1.1 Evaluar dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos.

1.2 Objetivos específicos

1.2.1 Caracterizar bioquímica y morfológicamente cuatro cepas bacterianas de referencia: ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538, ***Pseudomona aeruginosa*** ATCC 9027, ***Escherichia coli*** ATCC 8739 y ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028.

1.2.2 Implementar los procedimientos para la conservación por L-drying y cultivo en agar BHI de las cepas de referencia mencionadas, para ser utilizadas en un laboratorio para el control microbiológico de medicamentos.

1.2.3 Verificar la estabilidad bioquímica y la viabilidad de las cepas de referencia conservadas mediante los métodos durante un periodo de tres meses.

1.2.4 Elaborar un manual de procedimientos que incluya los métodos de caracterización, conservación y monitoreo de los cultivos de referencia en estudio.

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

3.0 Marco teórico

3.1 Control de calidad

Se trabajara con dos normativas para el control de calidad, referente a los materiales de referencia, estas se detallan a continuación:

3.1.1 Apartados de la Normativa ISO 17025 segunda edición año 2005 pertinentes a la investigación ⁽¹⁾

Según la normativa 17025 correspondiente a laboratorios de control de calidad en su apartado 5.6 pertinente a trazabilidad de las mediciones indica lo siguiente:

Todos los equipos utilizados para los ensayos o las calibraciones, incluidos los equipos para mediciones auxiliares (por ejemplo, de las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o en la validez del resultado del ensayo, de la calibración o del muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe establecer un programa y un procedimiento para la calibración de sus equipos. Además la norma indica que es conveniente que dicho programa incluya un sistema para seleccionar, utilizar, calibrar, verificar, controlar y mantener los patrones de medición, los materiales de referencia utilizados como patrones de medición, y los equipos de ensayo y de medición utilizados para realizar los ensayos y las calibraciones. Una vez examinadas las regulaciones establecidas por la normativa ISO/IEC 17025 podemos ver la importancia en sistemas donde son necesarias calibraciones para tener resultados confiables, también constituye un sistema que permite realizar un seguimiento del estado de los microorganismos de referencia utilizados y la constancia de sus características. Además el cumplimiento de estas condiciones permite la comparación de resultados entre laboratorios que operen bajo las mismas condiciones (Prueba y microorganismo de referencia) ⁽⁴⁾.

Podemos concluir que las características que buscamos para garantizar una buena calidad en la conservación de cultivos son:

- El mantenimiento de un cultivo puro.
- El mantenimiento de un cultivo con poca o ninguna variación en sus características fenotípicas y bioquímicas, que garanticen obtener resultados constantes bajo las mismas condiciones.
- El mantenimiento de cultivos que se puedan recuperar para su uso posterior por periodos prolongados de tiempo.

3.1.2 Apartados de la USP relacionados con el mantenimiento de cultivos microbiológicos ⁽²⁾

En el apartado <1117> de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) referente a mejores prácticas en el laboratorio de microbiología ⁽²⁾ nos habla sobre el mantenimiento de cultivos microbianos: Este capítulo menciona que la conservación de cultivos de reserva es el componente más importante para que un laboratorio de microbiología sea exitoso. Estos cultivos deben ser manejados con cuidado en todo momento para evitar su contaminación.

El cuidado de los cultivos comienza con su recepción. Un curador de cultivos de reserva confirma la identidad de los cultivos recibidos, aun si estos vienen de una fuente de confianza como lo son las colecciones de cultivos nacionales. Los errores pueden pasar. El uso incorrecto de una cepa en una prueba de compendio puede llevar el resultado de semanas o meses de trabajo con dudas.

El capítulo refuerza la recomendación de emplear la “técnica de siembra por lotes” para el mantenimiento de cultivos. Un elemento crítico para la implementación de esta técnica, es ir a los contenedores de reservas de cultivos solo una vez y restringir el número de pases. Se debe mencionar que no hay nada mágico acerca del número 5, este número de pases gana

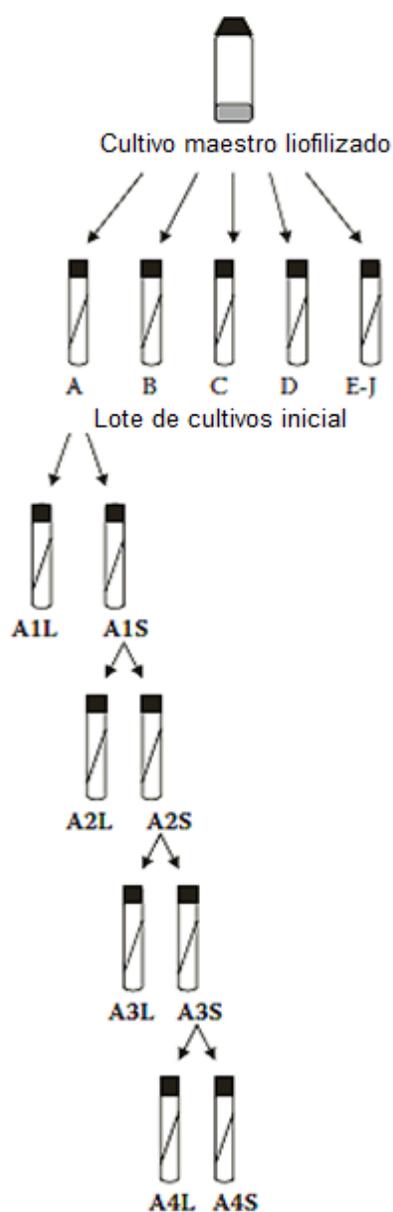
popularidad en el compendio por su uso en la prueba de esterilidad y ha sido mantenido para la consistencia. El propósito de esta práctica es que un laboratorio cuidadoso cuide la pureza y la identidad de sus cultivos de reserva limitando el potencial para la “deriva” debida a pases excesivos.

3.1.3 Manejo de cultivos por lotes.

Los parámetros de calidad para las prueba de compendios se ven directamente afectados por el estado metabólico y fisiológico de las cepas en los inóculos que se utilizan. Por lo que se hace importante tener un protocolo para el mantenimiento de los cultivos de reserva. Estos cultivos deberían ser adquiridos de fuentes como colecciones de cultivos nacionales. (3)

Debido a que la preparación y almacenamiento de los microorganismos afecta la fisiología de las células, los microbiólogos deben elegir el mejor método para el mantenimiento para evitar mutaciones y minimizar la variabilidad en las resistencias microbianas y viabilidad (3).

Muchos laboratorios usan la técnica de cultivo en lotes para el mantenimiento de cultivos de reserva, especialmente para los mantenidos en condiciones de refrigeración realizando los procedimientos ilustrados en la figura N°1. Mediante esta técnica los cultivos se transfieren a intervalos regulares, haciendo siembras por duplicado durante cada pase para maximizar la vida útil que pueda tener cada uno de los lotes semilla, considerando la regla de los 5 pases propuesta en el apartado <1117> de la USP. Adicionalmente como control, se realizan pruebas para verificar la identidad y viabilidad de las cepas conservadas (3).



Paso 1. Reconstitución del Cultivo Maestro según las especificaciones del proveedor

Paso 2. Transferencia a los medios de cultivo recomendados. Preparar 10 o más subcultivos semilla (Lotes de cultivo inicia o LCI) e incubar bajo las condiciones apropiadas. Observar el crecimiento, confirmar identidad y pureza utilizando un subcultivo representativo.

Paso 3. Después de un tiempo determinado, realizar una transferencia desde el Subcultivo LCI-A. Incubar bajo las condiciones apropiadas y observar el crecimiento. Descartar LCI-A.

Paso 4. Refrigerar A1L y A1S. Utilizar A1L para las pruebas en que se requiera y utilizar A1S para subcultivar.

Paso 5. En intervalos adecuados (una semana o un mes) Proceder con las transferencias mostradas a un lado hasta cumplir 4 pases.

Figura N°1 Esquema de manejo de cultivos de reserva por el método de cultivo por lotes (3)

3.2 Métodos de preservación de microorganismos

Los métodos de preservación de cultivos microbianos no son algo nuevo, desde los principios de la historia de la humanidad, estos se han llevado a cabo de diferentes maneras y han ido evolucionando (4).

En la antigüedad, para la producción de bebidas alcohólicas, de manera empírica, las personas involucradas en la producción desarrollaron la práctica de guardar una parte de la producción anterior para servir como una semilla para la siguiente producción (5).

Pero no fue hasta más adelante en la historia, cuando la microbiología como tal había tomado un auge, que las técnicas de conservación de cultivos de microorganismos que conocemos y aplicamos hoy comenzaron a surgir, desde el mantenimiento de cepas aisladas en soportes sólidos con agar y transferencias sucesivas, hasta la liofilización, que es considerada como uno de los mejores métodos de conservación de microorganismos en la actualidad (5).

Uno de los principales retos a los que se enfrentan los métodos de preservación de microorganismos es la variabilidad genética/fenotípica que puede existir en los cultivos que se usan, ya que su manipulación y pases sucesivos los hacen propensos a mutaciones genéticas espontáneas, esto se puede reducir de manera considerable reduciendo el metabolismo y actividad de las células que se están conservando, esto a la vez constituye una de las características deseables al momento de elegir un método para la conservación de microorganismos. Otro aspecto a tomar en cuenta para elegir un método de conservación para un microorganismo es el periodo de tiempo que se desea conservar, ya que los diferentes métodos disponibles hoy en día pueden lograr periodos de conservación desde meses hasta años.

Actualmente existen una gran cantidad de métodos para la preservación de los microorganismos de interés, ya sea para la producción, como referencias o para

el control de calidad de algunos productos. A continuación se detallan algunas de las técnicas más importantes utilizadas en la actualidad:

- Liofilización (Freeze-drying Liquid-drying)
- Congelación (Nitrógeno líquido y congelación de -20°C a -50°C)
- Conservación en tubos inclinados cubiertos de parafina
- Conservación por cultivo continuo
- Métodos restringidos (adherencia a un sustrato)

La conservación de microorganismos es una herramienta útil en muchas áreas como la industria, en la que se necesitan microorganismos que mantengan ciertas características debidamente identificadas. Los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos microbiológicos. Los cultivos de referencia o controles son utilizados en un amplio número de determinaciones, debido a que no pueden obtenerse resultados válidos si no se trabaja con cultivos de alta calidad. Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio ⁽⁵⁾.

3.2.1 Conservación por congelación.

Por este método se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crio-protector, algunos de los agentes más utilizados son leche descremada, azúcares solubles en agua y glicerol, se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura, preferiblemente de manera rápida. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir sistemas de refrigeración especiales como lo son los refrigeradores de bajas temperaturas o tanques de nitrógeno líquido, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada

de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas ⁽⁵⁾.

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método se muestran en la página siguiente:

- Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.
- Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas para la descongelación y graduales para la congelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.
- Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C.
- Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar.

En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C . Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C , como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con criobolas (bolas de tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano ***Clostridium***, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectar la viabilidad.

3.2.2 Conservación por liofilización ⁽⁸⁾.

La liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células (en el caso de la liofilización por freeze/drying). Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Sin embargo este proceso podría acabar afectando

a la viabilidad del microorganismo. No se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante un proceso suave. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, ya que se añade la sublimación del agua a la congelación previa. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo (5).

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación. Sin embargo, antes de pasar a explicar éstos, se tienen que hacer unas breves consideraciones acerca de la congelación previa. La congelación puede hacerse rápida (sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido), o lentamente. Respecto a los crioprotectores, se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liófilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el ácido glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o chopped meat (sin carne) para bacterias anaerobias, etc. (5).

Los factores que influyen específicamente, además de los ya mencionados en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

- Tipo de microorganismo. Hay algunos microbios que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.
- Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/ml en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
- Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
- Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
- Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
- Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C . Los liófilos se deben guardar en la oscuridad.

3.2.3 L-drying ^(6,7).

Es un método para la conservación de microorganismos mediante la remoción del agua libre del medio, el método fue propuesto por Annear en una serie de ensayos ⁽⁶⁾ y consiste en un sistema que consta de una bomba de vacío para reducir la presión del sistema, la que está unida a una trampa de agua cuya

función es retener el agua que se remueve de viales que contienen una suspensión de microorganismos mediante la reducción de la presión del sistema a una temperatura fácil de alcanzar, ya que la temperatura propuesta es 20°C. Los viales unidos al sistema por un tubo distribuidor una vez terminado el procedimiento, pueden al final ser llenados con una atmósfera inerte, cortados y sellados con una llama.

Un método simplificado es propuesto por Malik, KA; En una publicación por la Unesco para la realización de este procedimiento de manera simplificada cuyos materiales y equipos utilizados son de fácil acceso a la mayoría de laboratorios. El procedimiento ocupa como base para la fijación de los microorganismos, pastillas de una mezcla de carbono activado, leche descremada y miel de abejas; A la cual luego se agrega una suspensión del microorganismo a conservar, que luego se somete al procedimiento previamente descrito. Una ventaja de este método es su efectividad para conservar para algunos microorganismos sensibles a la conservación por otros métodos⁽⁶⁾.

3.2.4 Conservación por transferencia periódica ⁽⁵⁾

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características.

Al utilizar este método es aconsejable retrasar el envejecimiento y alargar los períodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras

como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C-8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Hay que tener en cuenta que los microorganismos muy aerobios, como por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados. Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos.

3.2.5 Métodos restringidos

Además de los métodos anteriormente mencionados existen metodologías restringidas, que consisten en la adición de una suspensión de microorganismos, a un sustrato estéril adecuado que puede ser tierra estéril, bolas de alginato, esferas de silica gel o en papel filtro entre otros sustratos, existen incluso kits con los que la preservación de cultivos microbianos se vuelve más simple, estos consisten en viales que contienen un sustrato previamente preparado al que prácticamente solo es necesario agregar una suspensión de microorganismo para lograr la conservación por un periodo de tiempo. (12,9)

La conservación por siembra en agar BHI se puede clasificar bajo esta categoría, y es una de los métodos a analizar en esta investigación. El método se fundamenta en el medio de conservación a largo plazo propuesto por el BAM (manual de análisis bacteriológico (9), al cual se le han realizado modificaciones,

sustituyendo algunos de sus componentes (extracto de levadura, cloruro de sodio y Peptona) por caldo BHI al 2.5% ⁽¹⁰⁾ Obteniéndose buenos resultados para la conservación de enterobacterias y otras especies por periodos largos prolongados de tiempo, ya que los resultados muestran que los cultivos mantuvieron una buena viabilidad así como sus características bioquímicas.

3.2.6 Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril ⁽¹¹⁾.

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en crio tubos de los anteriormente mencionados. En este caso la concentración celular no debe ser superior a 10^4 - 10^5 células/ml en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida. Algunos estudios muestran que cultivos que se han preservado de esta manera logran tener muy buenas viabilidades, especialmente cuando el agua esterilizada contiene cloruro de sodio al 0.85% con lo que se pueden conservar a bajas temperaturas (4-8°C), por años para el caso de hongos.

La Tabla N° 1 resume las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos descritos en los párrafos anteriores y algunos otros.

Tabla N° 1 Tiempo de almacenamiento, ventajas y desventajas de los diferentes métodos de conservación de mediano a largo plazo de microorganismos más utilizados ⁽⁸⁾

Método	Almacenamiento (años)	Ventajas	Desventajas
Agar	0.5-2	Simple, bajo costo, equipamiento requerido bajo	Secado del agar, baja estabilidad genética, riesgo contaminación
Aceite mineral	2-20	bajo costo, equipamiento requerido bajo	trabajo moderado, baja estabilidad genética
Congelamiento	4-5	Equipamiento requerido bajo, buena estabilidad genética	Requiere protectores, Alto costo de congelador (-80°C). Células pueden ser sensibles al O ₂
Nitrógeno líquido	Infinito	Preparación rápida, buena estabilidad genética	Suministro regular de N líquido
Liofilización	15-20	Bajo riesgo de contaminación, buena a regular estabilidad genética	Alto costo de equipamiento, no todas las especies pueden ser sometidas a este proceso
Agua	1-5	Simple , bajo costo, bajo equipamiento requerido, buenos resultados con hongos filamentosos	Estabilidad genética regular
L-drying	3-10	Simple , bajo costo, bajo equipamiento requerido	estabilidad genética

3.3 Caracterización de cultivos ⁽¹³⁾

Los profesionales que se desempeñan en la industria de medicamentos y/o cosméticos, deben conocer las normas que rigen la calidad microbiológica del producto a ser elaborado, los microorganismos objetables y el fundamento de los métodos oficiales para descartar la presencia de éstos. También en el caso de la industria alimentaria, los alimentos son sometidos a una serie de controles microbiológicos para asegurar la ausencia de microorganismos que pueden

causar enfermedades y/o descartar la presencia de toxinas capaces de causar intoxicaciones alimentarias.

Por estas razones, es importante conocer los métodos en los cuales se basa la identificación microbiana. No todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas. La mayor parte de los métodos se realizan en un laboratorio y se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles.

En la mayoría de los casos la identificación no se realiza con base a un solo método, sino a la combinación de más de uno para lograr una identificación más exacta.

3.3.1 Clasificación de los métodos de identificación microbiana.

Los métodos utilizados en la actualidad para la identificación microbiana, dependiendo de su fundamento, se pueden clasificar en:

- Criterios morfológicos
- Tinción diferencial
- Pruebas bioquímicas
- Tipificación con fagos
- Pruebas serológicas
- Detección molecular

3.3.2 Métodos basados en criterios morfológicos

Son métodos que utilizan características estructurales de los microorganismos ya sea a nivel microscópico o macroscópico para lograr distinguir a un microorganismo de otro, es decir, a nivel macroscópico podemos distinguir características la forma de la colonia y su aspecto como observamos en la figura 2 colonias circulares con un aspecto específico, mientras que a nivel microscópico se pueden distinguir la presencia de diferentes tipos de organeros

(cilios o flagelos y sus posiciones respectivas) o la presencia de esporas entre otras características.



Figura N° 2 Morfología macroscópica

3.3.3 Métodos basados en tinción diferencial

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. La mayor parte de las bacterias, teñidas con Gram, las podemos clasificar como Gram positivas o Gram negativas, debido a características presentes en la composición de su pared celular, en el caso de las Gram negativas esta pared se compone por una fina pared celular de peptidoglicano que no retiene el colorante durante la tinción de gran, mientras que las gran positivas presentan una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Se observa en la figura 3 una tinción al Gram en la que predominan los organismos Gram negativos. Otras tinciones diferenciales, como el ácido resistente, se aplican a otro tipo de bacterias, como por ejemplo micobacterias.



Figura N° 3 Tinción diferencial de Gram

3.3.4 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Aun bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes con base a pruebas bioquímicas. El tiempo necesario para la identificación de bacterias puede reducirse considerablemente con el uso de sistemas miniaturizados basados en pruebas bioquímicas. Estas herramientas que permiten reducir el tiempo del reporte, en primer lugar fueron elaborados para bacterias de importancia médica, tales como las enterobacterias. Estos sistemas han sido diseñados para realizar varias pruebas bioquímicas simultáneamente y permitir la identificación en un tiempo más corto. Cada uno de los ensayos, consta de tubos miniaturizados que contienen el medio de cultivo que se hidratan al inocularse con la suspensión bacteriana pura, lo que se muestra en la figura 4. Las pruebas se clasifican en grupos; a cada uno de resultados positivos de los ensayos de se le asigna un determinado valor numérico, obteniéndose un código que corresponderá a un determinado género o especie en un texto de la base de datos.



Figura N° 4 Sistema de Pruebas bioquímicas API

En la tabla N° 2 se presentan los métodos de caracterización de cultivos más comúnmente utilizados en análisis microbiológicos.

Tabla N° 2 Métodos de caracterización de microorganismos ⁽⁸⁾

Método	Características examinadas	Ejemplos de características
Morfología Macroscópica	Colonias	Tamaño; color; textura; translucidez; características del borde
Morfología microscópica	Forma celular, tamaño y estructuras	Cocos; bastones; espirales; esporas flagelos; capsulas
	Reacciones de tinción	Gram; ácido resistente
Productos metabólicos	A partir de carbohidratos y compuestos relacionados	Ácidos; gases (CO ₂ ; H ₂); alcoholes; aldehídos; cetonas
	A partir de compuestos nitrogenados	Indol; gas de nitrógeno; amoníaco
Requerimientos nutricionales	Materiales Traza	Minerales; vitaminas y otros factores
	Fuentes de Nitrógeno	Proteínas; aminoácidos; compuestos inorgánicos; nitrógeno atmosférico
	Fuentes de carbono	Compuestos orgánicos; CO ₂ , Carbohidratos
	Fuentes de energía	Compuestos orgánicos e inorgánicos: luz
Fisiología	Requerimiento de oxígeno	Anaerobios; anaerobios facultativos; estrictamente aeróbicos
	Temperatura de crecimiento	Psicrofilos (0-15C); mesófilos (25-45C); termófilos (55C+)
	Actividad enzimática	Catalasa; oxidasa; nitrato reductasa
	Tipo de metabolismo	Oxidativo o fermentativo

3.4 Control de calidad de cultivos

Las colecciones de cultivos deben desarrollar programas de investigación para determinar y asegurar la estabilidad de las cepas. Las propiedades conocidas deben chequearse periódicamente, pero para estimar la estabilidad con precisión debe seleccionarse una propiedad que no sea estable en la cepa y chequear su comportamiento en el tiempo (siempre que sea posible) ⁽¹³⁾. Los estudios de estabilidad pueden incluir el chequeo en el tiempo de la viabilidad, la pureza y la identidad de las cepas. La viabilidad se refiere al mantenimiento

de la funcionalidad de la célula para llevar a cabo los procesos de su ciclo de vida: crecimiento, multiplicación.

En la Tabla 3 se ejemplifican las propiedades de los microorganismos utilizadas para su identificación así como un breve ejemplo de y la manera en que se aplican para la identificación:

Tabla N° 3 Características a evaluar en los cultivos para la determinar la variabilidad de los cultivos (12)

Característica	Ejemplo	Aplicabilidad
Viabilidad	Conteo de colonias en placas si es posible; si no es posible, determinar los conteos celulares microscópicamente; para cultivos filamentosos, usar el radio de crecimiento de las hifas a través del tiempo	Todos los cultivos
Pureza	Examinar por contaminantes a través de cultivos y microscopía; PCR, hibridación de ADN, etc.	Todos los cultivos
Morfología	Apariencia del cultivo (color, olor exudados, pigmentos, tipo y cantidad de esporas)	Hongos, algas, bacterias, actinomicetos
Formación de productos	Cuando sea aplicable, se puede medir el producto formado bajo condiciones determinadas y cuantificar periódicamente (determinado por el desarrollo de procedimientos estandarizados)	Todos los cultivos
Productos metabólicos	A partir de carbohidratos y compuestos relacionados	Ácidos; gases (CO ₂ ; H ₂); alcoholes; aldehídos; cetonas
	A partir de compuestos nitrogenados	Indol; gas de nitrógeno; amoniaco
Requerimientos nutricionales	Materiales Traza	Minerales; vitaminas y otros factores
	Fuentes de Nitrógeno	Proteínas; aminoácidos; compuestos inorgánicos; nitrógeno atmosférico
	Fuentes de carbono	Compuestos orgánicos; CO ₂ , Carbohidratos
	Fuentes de energía	Compuestos orgánicos e inorgánicos: luz

Tabla N° 3 Continuación.

Fisiología	Requerimiento de oxígeno	Anaerobios; anaerobios facultativos; estrictamente aeróbicos
	Temperatura de crecimiento	Psicrofilos (0-15C); mesófilos (25-45C); termófilos (55C+)
	Actividad enzimática	Catalasa; oxidasa; nitrato reductasa
	Tipo de metabolismo	Oxidativo o fermentativo

3.5 Estabilidad Bioquímica (13).

Se refiere al mantenimiento de las características bioquímicas de un microorganismo a lo largo del tiempo, es decir aquellas que denotan características específicas del metabolismo y productos desarrollados a partir de éste, es en pocas palabras, que las características identificadas inicialmente del microorganismo en estudio se mantengan a lo largo del estudio determinando que el microorganismo mantiene su identidad y su utilidad, garantizando obtener los resultados esperados, lo que hace de esta característica una de las más importantes para evaluar la efectividad de un método de conservación de microorganismos además de garantizar la viabilidad de los microorganismos.

3.6 Características de los microorganismos en estudio

A continuación en la tabla N°4 se describen brevemente propiedades que identifican a cada uno de los microorganismos a estudiar en la presente investigación, respecto a su morfología macroscópica, características bioquímicas, morfología microscópica y aplicaciones en farmacia respectivamente:

Tabla N° 4 Características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio

Rasgo Bacteria	Morfología Macroscópica (14)	Características Bioquímicas(14)	Tinción al Gram(14)	Aplicaciones en farmacia (2).
<i>Salmonella typhimurium</i>	Colonias circulares, convexas de borde redondo y aspecto cremoso, Colonias grandes de 2 a 4 mm, rugosas o lisas (18). En agar Bismuto-sulfito, presenta colonias de negro a verdoso.	Indol (-), ureasa (-), lipasa (-), Lisina (+), Ornitina (+), Citrato de Simmons (+), H ₂ S (+) y Movilidad (+). Resiste la congelación en agua y la desecación	Bacilos de 0,7 – 1,5 x 2 – 5 µm, Gram negativos, generalmente móviles peritricos	<ul style="list-style-type: none"> - Control de calidad de medios de cultivo - Control de prueba preparatoria de límites microbianos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sobre medios sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes de color gris a dorado. En agar Baird-Parker se muestra como colonias negras puntiformes con un halo transparente alrededor. Pueden producir grado variable de hemolisis.	Coagulasa (+) fibrinolisin(+), hialuronidasa (+) term nucleasas (+) bacteriocinas (+) penicilinasas (+) ADNasa (+)	Cocos gran positivos que forman racimos en forma de uva	<ul style="list-style-type: none"> - Prueba de eficacia de preservantes - Control de calidad de medios de cultivo - Prueba de Límites microbianos
<i>Escherichia coli</i>	Las colonias en agar nutritivo son lisas, convexas, húmedas de superficie brillante con bordes lisos.	Oxidasa, (-), Voges Proskauer (-), H ₂ S (-) , Ureasa (-) , lipasa (-), Catalasa (+), rojo de metilo (+)	Son bacilos rectos Gram negativos de 1.1 -1.5µm de ancho por 2 – 6µm de largo. Se presentan aislados o en pares y pueden o no poseer cápsula	<ul style="list-style-type: none"> - Pruebas de resistencia de coliformes en agua. - Control de calidad de medios - Prueba de Limite microbiano.

Tabla N° 4 Continuación.

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Colonias mucoides, rugosas. La mayoría presenta una coloración verde por la difusión de pigmentos. Crece con un color verde característico en agar cetrimide	Puede producir pioverdina (pigmento verde), piorrubina (pigmento rojo) piocianina, Catalasa (+), Oxidasa (+).	Bacilos rectos o ligeramente curvados, de 0.5-1.0 x 1.5-5.0µm, con flagelos unipolares, no visibles a la tinción.	<ul style="list-style-type: none"> - Pruebas de sensibilidad . - Control de calidad de medios - Prueba de Limite microbiano.
-------------------------------------	--	---	---	---

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 Diseño Metodológico

4.1 Tipo de estudio

- **Transversal** Se compararon las condiciones y la efectividad entre dos métodos de conservación de microorganismos, dentro del laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, durante el último trimestre del año 2012.
- **Experimental** Se realizaron comprobaciones de las características bioquímicas de las cuatro cepas en estudio utilizadas como material de referencia en microbiología de medicamentos.
- **Exploratorio** Se evaluó la capacidad de los métodos de conservación, L-drying y siembra en agar BHI, de mantener las características bioquímicas y la viabilidad de cuatro cepas bacterianas.

4.2 Investigación bibliográfica

Para la revisión bibliográfica de la investigación se consultaron:

- Biblioteca de Facultad de Química y Farmacia Dr. Benjamin Orozco (UES)
- Biblioteca de la Facultad de Medicina (UES)
- Internet

4.3 Esquema general del procedimiento experimental

Las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, provenientes de una colección de crio-viales de cultivos tipo de la ATCC se trabajaron de acuerdo al siguiente esquema general (Figura 5), cuyos procedimientos específicos se describen en las secciones siguientes y además en el manual de procedimientos.

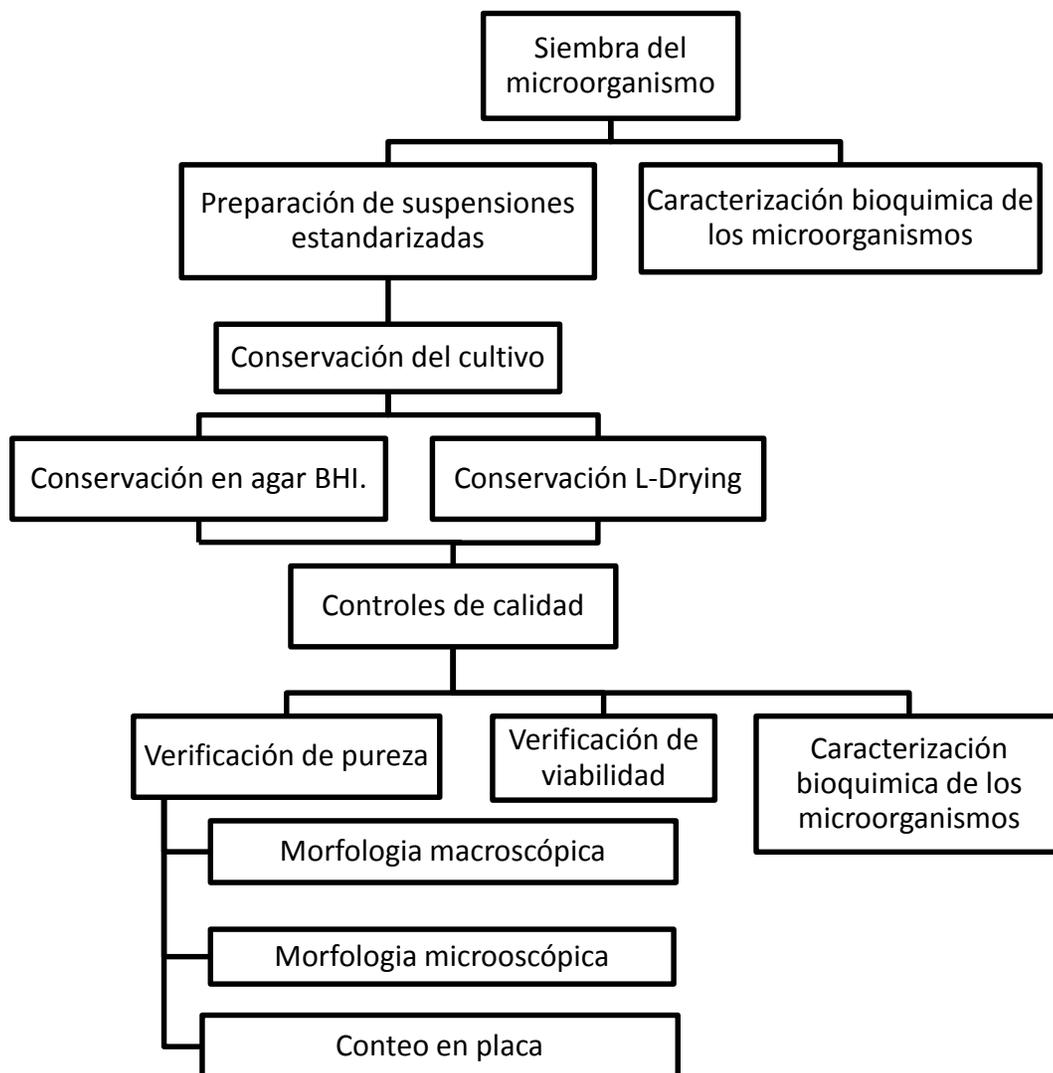


Figura N°5. Metodología general de la investigación.

4.3.1 Preparación de suspensiones estandarizadas

Se sembraron las cepas provenientes de viales de cultivos ATCC en dos placas de Petri con agar nutritivo y se incubaron a 35 °C por 48 horas.

Después de la incubación se procedió a la preparación de las suspensiones madre estandarizadas, arrastrando el crecimiento de las placas de cada microorganismo con buffer fosfato pH 7.4 estéril. Las suspensiones así

preparadas se ajustaron a valores de absorbancia determinada experimentalmente mediante el uso de un espectrofotómetro UV/Vis (Figura N°6, Anexo N°2) a una longitud de onda de 590 nm. Se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones estandarizadas y se hicieron recuentos mediante el plaqueo de 0.1 mL de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Para poder determinar la absorbancia adecuada que permitiera tener un recuento de 10^{10} UFC/mL en la suspensión estandarizada.

4.3.2 Caracterización de los microorganismos

Una vez obtenidas las suspensiones estandarizadas y, antes del proceso de conservación, se realizaron las pruebas para la caracterización de los microorganismos como se detallan en la siguiente tabla.

Tabla N°5. Pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos en estudio.

Microorganismo	Pruebas realizadas
<i>St. Aureus</i> ATCC 6538	Siembra en agar Baird Parker, siembra en agar manitol, prueba de coagulasa, prueba de la catalasa.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 1027	Siembra en agar cetrimide, crecimiento a 41.5 °C, prueba de nitratos.
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Identificación por sistema RapidONE 20E, pruebas IMVIC
<i>S. thyphimurium</i> ATCC 14028	Identificación por sistema RapidONE 20E, pruebas IMVIC

4.3.3 Conservación de los microorganismos

A cada una de las suspensiones conteniendo 10^{10} UFC/mL de cada uno de los microorganismos se le aplicaron los procedimientos de conservación en estudio:

4.3.3.1 Método de L-drying.

Se utilizó un sistema constituido por tres elementos (Figura N°8):

- Una bomba de vacío, con funcionamiento a una presión de vacío de 5 mbar durante el proceso.

- Una trampa de agua, conteniendo sílica gel activada sumergida en un baño frío que consiste en alcohol etílico vertido sobre una porción de hielo seco en un recipiente de metal, para remover y retener el exceso de agua que se está descartando del desecador.
- Desecador. Conectado a la trampa y consecuentemente a la bomba de vacío. Dentro del desecador se colocan los tubos de microcentrifuga conteniendo 0.1mL de la base para la conservación (20% de leche descremada 10% de carbón activado y 5% de miel) junto con 0.1mL de la suspensión de los microorganismos conteniendo 10^{10} UFC/mL de cada cepa estudiada. La temperatura dentro del ambiente del desecador debió mantenerse alrededor de 20°C durante las 2 horas que duró el proceso (ver Figura N°7).

Mediante la reducción de la presión en el sistema, el agua de los preparados pasó a la atmosfera y fue retenida en la trampa de agua, luego del procedimiento se obtuvo un producto seco que fue conservado a una temperatura menor de 10°C .



Figura N°7. Sistema utilizado para la conservación de las bacterias por el método

4.3.3.2 Método de conservación en agar BHI

Se sembraron los microorganismos en estudio por la técnica de pique: un asa en punta se humedece con la suspensión de los microorganismos conteniendo 10^{10} UFC/mL de cada cepa estudiada y se inoculó hasta la mitad del tubo

conteniendo medio de cultivo BHI, el cual se encontraba envasado en tubos vidrio de borosilicato de 75x12 mm con tapón de algodón y gasa. Posteriormente estos tubos fueron incubados por 24h a una temperatura de 37°C, y finalmente almacenados a temperatura ambiente.

4.3.4 Control de calidad de los microorganismos conservados.

Una vez aplicados los procedimientos de conservación, se realizaron los procesos de reanimación de los cultivos, mostrados en la figura 8 (Anexo N°2) y los controles posteriores, en los siguientes tiempos: inmediatamente después del proceso, a los 1.5 y 3 meses.

Los controles realizados fueron:

- Verificación de la viabilidad de los cultivos mediante recuento en placa por extendido. Se hicieron las diluciones seriadas mostradas en las figuras 9 y 10 (Anexo N°2). Una vez realizadas las diluciones se procedió a inocular placas con agar nutritivo por el método de extendido, tomando 0.1mL de las suspensiones con concentraciones teóricas de 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL e incubándolas a 35°C por 48 horas, para obtener placas en un rango fácil de contar y verificar la viabilidad bacteriana. Una vez realizado el conteo, se tomaron colonias aisladas y se sembraron por el método de estría en una placa de agar nutritivo y se incubaron a 35°C por 24 horas para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas correspondientes a cada microorganismo.
- Verificación de la pureza mediante la identificación de la morfología microscópica y macroscópica (Tabla N°6)
- Caracterización bioquímica. Las pruebas bioquímicas realizadas involucran la siembra en medios selectivos y otras pruebas mencionadas en la tabla N°5.

Tabla N°6. Resultados esperados de verificación de la pureza de los cultivos conservados.

Microorganismo	Morfología microscópica	Morfología macroscópica (Agar nutritivo)
<i>St. aureus</i> ATCC 6538	Cocos Gram positivos que forman racimos en forma de uva	Colonias grises o amarillo dorado, redondas, borde liso.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 1027	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias mucoides, borde rugoso, presentan coloración verde
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias redondas convexas, borde liso
<i>S. thyphimurium</i> ATCC 14028	Bacilos cortos Gram negativos	Colonias redondas, borde liso, usualmente de 2-4mm de diámetro

4.4 Partes con las que cuenta el manual de procedimientos

Portada

Índice

I. Objetivo

II. Alcance

III. Procedimientos. Cada uno de los procedimientos contendrá las

Siguientes partes:

- Encabezado
- Materiales y equipo
- Reactivos y medios de cultivos
- Desarrollo
- Esquema general del procedimiento

IV. Formulario

V. Glosario de abreviaturas

4.5 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos durante los periodos de tiempo evaluados (antes del proceso de conservación, después de aplicar el proceso y 1.5 y 3 meses después) fueron analizados estadísticamente para verificar la existencia de diferencias significativas en la viabilidad de los cultivos conservados por los métodos evaluados, a continuación se describe de manera más detallada como se realizó el análisis estadístico anteriormente mencionado para cada parámetro:

- a) Viabilidad. Para determinar diferencias en los recuentos de microorganismos recuperados se utilizó el análisis de varianza multifactorial para muestras aleatorias independientes (ANOVA) (20).

El análisis ANOVA es una herramienta estadística que mediante el análisis de la varianza de grupos de datos, permite determinar si existe una diferencia significativa entre un grupo afectado por diferentes factores. Para nuestra investigación se tomaron en cuenta tres factores en sus diferentes niveles, estos factores son:

- **Tiempo:** evaluado antes del proceso (t=pre-proceso), inmediatamente después del proceso (t=post-proceso), a los 1.5 meses (t=1.5 meses) y 3 meses después (t = 3 meses).
- **Método:** evaluado en los métodos de L-drying (t=L-drying) y siembra en agar BHI (t=BHI)
- **Microorganismo:** evaluado para cada uno de las 4 cepas en estudio para los dos métodos (t=E.coli, t=Salmonella, t=Ps. Auruginosa, t=St. aureus).

Las observaciones pueden describirse mediante el modelo estadístico lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \theta_k + \varepsilon_{ijkl} \quad \left\{ \begin{array}{l} i= 1,2,3,4 \\ j= 1,2 \\ k= 1,2,3,4 \\ l=1,2 \end{array} \right.$$

Dónde:

Y_{ijkl} : Variable respuesta (Conteos de viabilidad) β_j : Efecto en el conteo debido al j-ésimo método evaluado

μ : Conteo promedio de viabilidad θ_k Efecto en el conteo debido al k-ésimo microorganismo evaluado

τ_i : Efecto en el conteo del tiempo debido al i-ésimo tiempo evaluado ε_{ijkl} : Componente aleatoria del error

ANOVA parte de una hipótesis nula en la que todas las medias entre los factores son iguales, es decir no hay una diferencia significativa, en el caso contrario hay una diferencia entre las medias lo que indica que el factor evaluado influye en la variable respuesta. Para los factores a evaluar tenemos las siguientes hipótesis:

- Para el tiempo
 - $H_0: \mu_{\text{pre-proceso}} = \mu_{\text{post-proceso}} = \mu_{1.5\text{meses}} = \mu_{3\text{meses}}$
 - H_a : por lo menos dos de las μ son diferentes
- Para el microorganismo
 - $H_0: \mu_{E.coli} = \mu_{Salmonella} = \mu_{1Ps.aeruginosa} = \mu_{St.aureus}$
 - H_a : por lo menos dos de las μ son diferentes
- Para el método
 - $H_0: \mu_{L-Drying} = \mu_{BHI}$
 - H_a : por lo menos dos de las μ son diferentes

Los factores anteriores fueron analizados por la prueba F, a un nivel de confianza del 95%; es decir, $\alpha = 0.05$. La tabla de la distribución F teórica se muestra en el anexo N°1 y las fórmulas para construir el análisis de varianza se muestran en el anexo N°3.

Las suposiciones que fundamentan el análisis de varianza son que los datos estén descritos de manera adecuada por el modelo estadístico y que los errores sean independientes y se encuentren distribuidos de manera normal con media cero y varianza constante σ^2 . Para la aplicación del modelo se verifican las suposiciones anteriores.

En el caso de las hipótesis en las que mediante ANOVA se demostró diferencias significativas de alguna de las medias, se aplicó la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD-por sus siglas en inglés), la cual mediante un procedimiento de comparación múltiple determinó cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras.

Adicionalmente, para el caso de los datos de viabilidad del método BHI se hicieron gráficas de porcentaje de viabilidad residual vs tiempo. La viabilidad residual se calculó mediante la siguiente fórmula en los cuatro tiempos estudiados (Pre-proceso, post-proceso, 1.5 meses y 3 meses):

$$\text{Viabilidad residual (\%)} = 100 (N/N_0)$$

Dónde: N_0 es la viabilidad celular inicial de la muestra (Pre-Proceso)

N es la viabilidad celular en el tiempo t

Las gráficas de viabilidad residual se realizaron usando el programa EXCEL, mediante el cual también se les añadió una línea de tendencia exponencial con una fórmula base:

$$Y = y_0 e^{\beta t}$$

Dónde:

Y = viabilidad residual

β : tasa de decrecimiento de la viabilidad inicial

y_0 : viabilidad inicial

t : tiempo (meses)

e : número de Euler

Se determinó su ecuación y coeficiente de correlación para cada cepa de los microorganismos conservados. De la ecuación obtenida se despejó el tiempo y se sustituyó el valor de la cantidad de microorganismos viables residuales por el valor 0.0000001%, con el objeto de encontrar el tiempo en el que aún fuera posible encontrar al menos 100 UFC (0.0000001%) de microorganismos viables en el tubo conservado.

b) Estabilidad bioquímica. Los datos obtenidos a partir de las pruebas API y las pruebas de caracterización bioquímica para cada microorganismo, para la verificación de la estabilidad bioquímica fueron organizadas en tablas de contingencia.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 Resultados y Discusión de Resultados

5.1 Caracterización inicial de las cepas

En las tablas N°7 y 8; y figuras N°11 y 12 se detallan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, para el establecimiento de la identidad de los cultivos conservados.

Tabla N°7. Resultados iniciales de las pruebas bioquímicas realizadas a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Prueba Tiempo	Coagulasa	Agar Baird Parker	Catalasa	Agar Chapman
Resultado esperado positivo.	Formación de coagulo	Colonias negras con halo	Formación de burbujas	Viraje de indicador a amarillo
Criterio de aceptación para inóculo inicial	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla N°8. Resultados iniciales de las pruebas bioquímicas realizadas a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027

Prueba Tiempo	Cetrimide	Nitratos	Crecimiento a 41°C	Oxidasa
Resultado esperado positivo.	Colonias de color verde	Coloración roja al agregar reactivo	Presencia de turbidez	Papel reactivo se torna violeta
Criterio de aceptación para inóculo inicial	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Los resultados de las pruebas bioquímicas que se muestran en las tablas N°7 y 8 concuerdan con los resultados propuestos por el manual de Bergey's de microbiología identificativa ⁽¹⁹⁾ para *St aureus* y *P. aeruginosa* y lo indicado en los certificados de las cepas (anexo N°3).

Los resultados del sistema computarizado RapidONE realizados a las cepas evaluadas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* indicaron la presencia de: *Salmonella cholerasius* (Figura N°11) con un nivel de identificación de 98.64%, y *Escherichia coli* (Figura N°12) con un nivel de identificación mayor de 99.99%. Ambos resultados están dentro de un nivel aceptable de identificación con un error menor al 10%⁽²⁵⁾.

La identificación mediante el sistema RapidONE de *Salmonella typhimurium* (*Salmonella choleraesuis* serovar: *typhimurium*) solo permitió obtener la especie y genero del microorganismo como: *Salmonella choleraesuis*. Por lo que en el resto del documento se hará referencia a este así.

ERIC Web		Identification Report												
RapID ONE														
Microcode: 6120010		Run Date: 21/11/2013		Facility: Universidad de El Salvador										
		Reference No: SAL												
System Tests	-URE	00%	+LDC	94%	-KSF	00%	-ONPG	00%	-NAG	00%	+GGT	95%	-IND	00%
	+ADH	60%	-TET	56%	+SBL	90%	-βGLU	00%	-MAL	00%	-PYR	00%	-OXI	00%
	+ODC	98%	-LIP	00%	-GUR	11%	-βXYL	00%	-PRO	07%	-ADON	00%		
IDENTIFICATION = Salmonella Group 1														
Choice	Probability		Bioscore		Contraindications									
Salmonella choleraesuis	98.16%		1/6		None									
Salmonella 1 (Most)	1.84%		1/39		TET [91]									
Probability Level: Implicit Biofrequency: Typical														
Salmonell group 1. Pathogenic for man and animals. O group C1. Arabinose and trehalose negative.														

Figura N°11. Resultados del sistema de identificación Digital Rapid ONE para *Salmonella cholerais* serovar: *typhimurium*

ERIC Web		Identification Report												
RapID ONE														
Microcode: 6161001		Run Date: 21/11/2012		Facility: Universidad de El Salvador										
		Reference No: EC												
System Tests	-URE	01%	+LDC	84%	-KSF	01%	+ONPG	95%	-NAG	00%	-GGT	44%	+IND	98%
	+ADH	15%	-TET	02%	+SBL	90%	-βGLU	01%	-MAL	01%	-PYR	01%	-OXI	00%
	+ODC	75%	-LIP	00%	+GUR	92%	-βXYL	00%	-PRO	03%	-ADON	02%		
IDENTIFICATION = Esc. coli														
Choice	Probability		Bioscore		Contraindications									
Esc. coli	> 99.9%		1/28		ADH [15]									
Probability Level: Satisfactory Biofrequency: Acceptable														
Isolated from a wide variety of clinical specimens and infections. Includes E. coli 'inactive' Alkaesens-Dispar (nonmotile anaerogenic O antigen) and 'enteropathogenic' designations.														

Figura N°12. Resultados del sistema de identificación Digital Rapid ONE para *E. coli*.

Mediante las pruebas bioquímicas realizadas se logró identificar la especie y género de los microorganismos utilizados, así como sus características bioquímicas más determinantes. Lo cual proporciona la certeza de utilizar las cepas requeridas como microorganismos estándares para los ensayos microbiológicos realizados a productos farmacéuticos. Confirmando las características indicadas en los certificados (anexo N°4).

5.2 Conservación de las cepas

De la implementación de los procesos de conservación por L-Drying y agar BHI se obtuvieron 10 viales de cada microorganismo conservado en cada método (Figura N°13).



Figura N°13. Viales con bacterias conservadas por L-drying (Izquierda) y siembra en agar BHI (Derecha)

Para la evaluación de la viabilidad y características bioquímicas de los cultivos, se utilizó un vial de cada una de las cuatro cepas conservadas para cada evaluación realizada: post-tratamiento, 1.5 meses y 3 meses, haciendo un total de 3 viales utilizados por cada microorganismo, dejando un total de 7 viales de cada cepa en reserva para investigaciones posteriores.

5.2.1 Conservación por el método L-drying

Durante la realización de éste procedimiento se observaron dos desviaciones respecto a los parámetros de desempeño propuestos: el desecador de vidrio con adaptador para vacío. Solamente se pudo mantener a una temperatura de

25°C, es decir 5°C mayor a la propuesta en la bibliografía (11); además la bomba de vacío no alcanzó los 5mBar deseados (11). Ambos factores anteriormente mencionados afectaron el proceso ya que de acuerdo a la ley de los gases ideales ($PV=nRT$) la presión y la temperatura afectan el volumen y estado del agua presente dificultando la pérdida de humedad de los cultivos, por lo que se dejaron los cultivos por dos días más en el desecador para eliminar el exceso de humedad en los viales. Una vez finalizado el proceso estos fueron almacenados en bolsas estériles selladas en un refrigerador a una temperatura de 4-10°C.

La reanimación de los cultivos conservado mediante este método se realizó agregando 0.3mL de caldo nutritivo a cada vial a analizar y dejándolo reposar por una hora para luego realizar los recuentos de microorganismos.

5.2.2 Conservación por el método de siembra en agar BHI.

La conservación de los microorganismos por siembra en agar BHI se llevó a cabo siguiendo todas las condiciones anteriormente descritas en la metodología. Los cultivos conservados por este método fueron cubiertos con una lámina de papel parafilm para evitar la pérdida de humedad de los cultivos, luego estos fueron almacenados en un contenedor de durapax previamente sanitizado, manteniendo a una temperatura aproximada de 26-27°C a lo largo de la realización de la investigación, los datos y graficas del control de la temperatura durante la realización del estudio se muestran en el anexoN° 5.

Para la reanimación de los cultivos, el contenido de los tubos con los microorganismos fue triturado utilizando un asa estéril y resuspendiendo mediante lavados con Buffer fosfato pH 7.4 para recuperar el cultivo, hasta lograr un volumen de 30 mL, que se homogenizó en un tubo estéril con ayuda de un vortex, para proceder finalmente con el recuento mediante el procedimiento mostrado en la sección 2.3.4 de los materiales y métodos.

5.3 Viabilidad y conservación de propiedades bioquímicas.

La figura N°14 en la siguiente página muestra que se observaron fenómenos diferentes de comportamiento de viabilidad para cada método los datos crudos de conteo correspondiente a cada método se muestran en el anexo N°6.

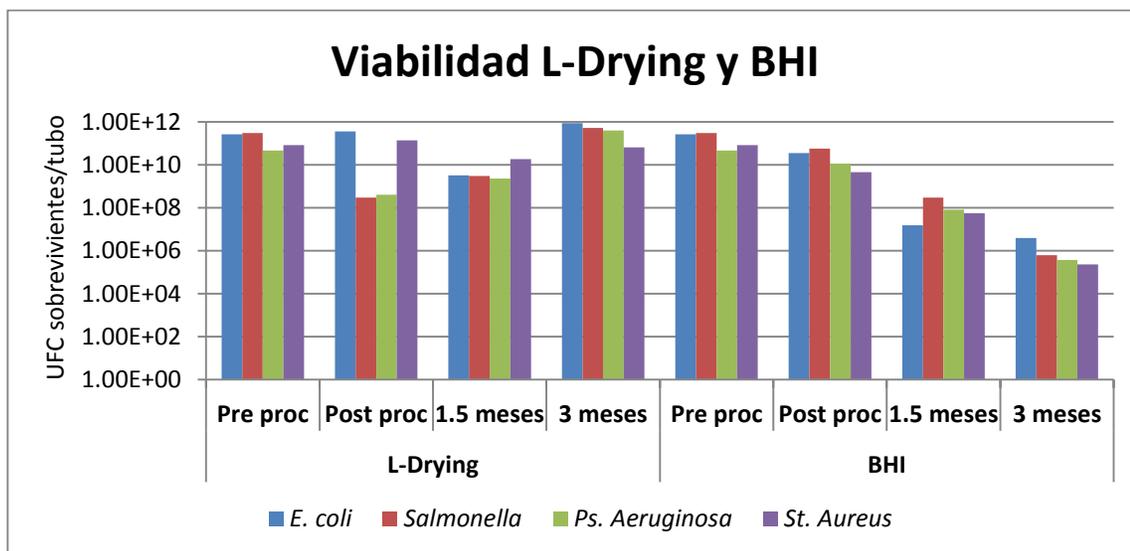


Figura N°14. Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por el método L-drying (Izquierda) y el método de BHI (derecha).

En el caso del método de L-Drying se observa que hay un descenso de la viabilidad del *Salmonella* y *Pseudomona aeruginosa* después de la aplicación del proceso, para luego observarse aumento de los microorganismos viables correspondientes a estas cepas a los 1.5 meses y 3 meses de conservación.

Siempre en el método de conservación por L-Drying, no se observa cambio en la viabilidad de *E.coli* y de *St. aureus* por la aplicación del proceso. Sin embargo, si se observa un leve descenso de las cepas mencionadas a los 1.5 meses, seguido de un aumento de viabilidad a los 3 meses.

Por otro lado para el método de BHI se observa un comportamiento más homogéneo de los microorganismos, caracterizado por un descenso constante

de la viabilidad de todos los microorganismos estudiados tanto después de la aplicación del método como a los 1.5 y 3 meses.

Al aplicar el análisis de varianza a los datos de los conteos promedio se obtuvieron los resultados indicados en la Tabla N°9.

Tabla N°9. Análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo, tiempo y Método para un nivel de confianza de 95%

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Metodo	1.93286E23	1	1.93286E23	6.67	0.0164
B:Microorganismo	2.22051E23	3	7.40169E22	2.55	0.0793
C:Tiempo	1.41147E23	3	4.70491E22	1.62	0.2104
RESIDUOS	6.95975E23	24	2.8999E22		
TOTAL (CORREGIDO)	1.25246E24	31			

La tabla anterior muestra que los datos son significativamente diferentes entre los métodos de conservación aplicados a los microorganismos ($P=0.0164$).

En contraste, el Análisis de Varianza indica que los factores tiempo y especie de microorganismo son factores que no generan diferencias significativas; es decir que al considerar los datos totales no se puede considerar que hay variaciones significativas por tipo de microorganismo ni por tiempo ($P>0.05$ para las hipótesis que involucran estas variables).

Dado que dentro de los objetivos de la tesis se encontraba verificar las variaciones en viabilidad de las cepas en estudio bajo las condiciones de conservación aplicada, se decidió realizar nuevamente el análisis de varianza pero utilizando solamente los datos para cada tratamiento aplicado, cuyos resultados se encuentran en las siguientes secciones.

Es importante mencionar que paralelamente a la realización del análisis ANOVA se verificaron los supuestos para la aplicabilidad del modelo, los cuales muestran en la siguiente página (figuras N° 15 y 16):

- 1) una tendencia lineal de la distribución de probabilidades de los residuos, lo que verifica la distribución normal

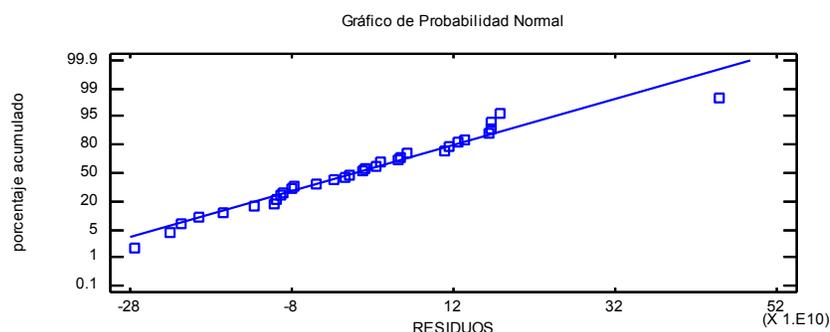


Figura N°15. Grafica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: método, tiempo microorganismo).

- 2) Una gráfica de residuales que muestra que estos no siguen ningún patrón en específico, lo que demuestra la independencia de los resultados y su aleatoriedad.

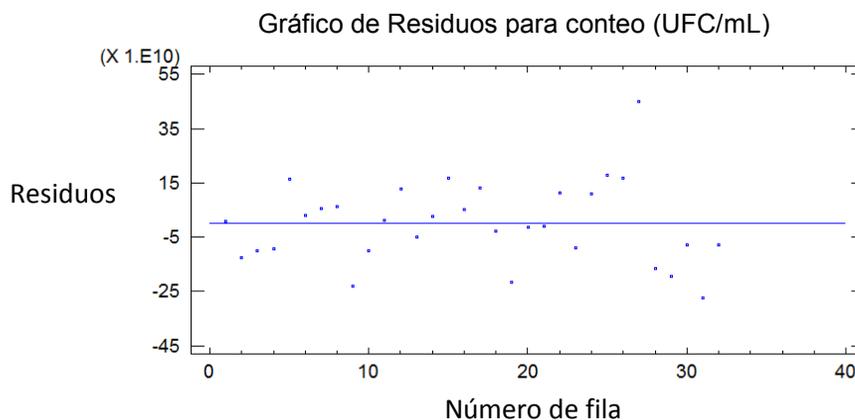


Figura N°16. Homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: método, tiempo microorganismo).

Las evidencias anteriores evidenciaron la adecuabilidad de los datos al modelo por lo cual no hubo necesidad de una transformación de los datos para su análisis.

5.3.1 Viabilidad de los microorganismos por L-drying.

Los resultados del proceso de conservación por el método de L-Drying se presentan en la Figura N°17.

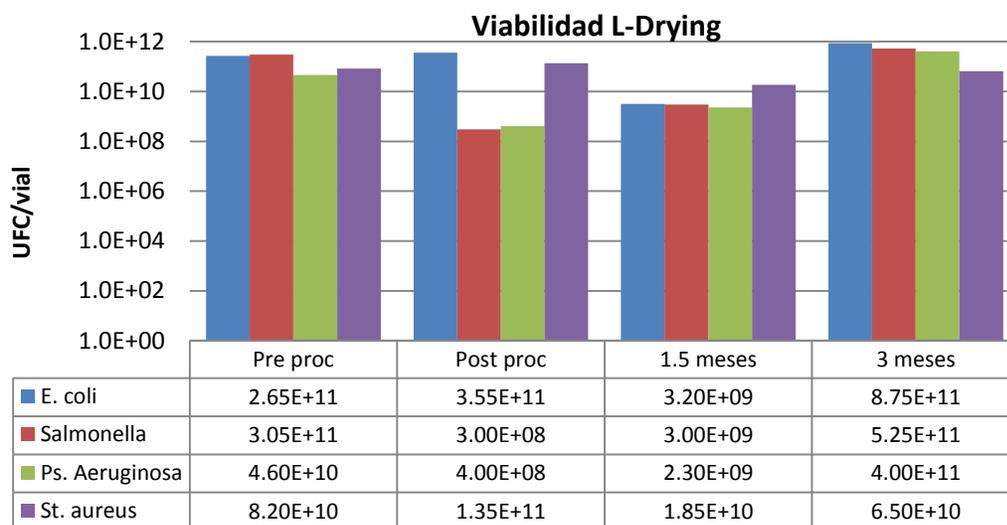


Figura N°17. Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por L-drying

Como se mencionó en la sección anterior, se observaron variaciones bastante heterogéneas de los diferentes microorganismos en el tiempo. Al aplicar el análisis de varianza a los datos, tomando solamente en cuenta los factores tiempo y microorganismo, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla N°10. Previo a la aplicación de este modelo se verificaron de nuevo los supuestos, como se muestra en las figuras N°18 y 19.

Tabla N°10. Datos de análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo y tiempo a un nivel de confianza de 95% para el método de conservación por L-Drying.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Microorganismo	6.44526E23	3	2.14842E23	13.84	0.0000
B:Tiempo	1.10423E24	3	3.68078E23	23.70	0.0000
RESIDUOS	3.26094E23	21	1.55283E22		
TOTAL (CORREGIDO)	1.81927E24	27			

De tal manera que se estableció un nuevo modelo para el análisis dejando a un lado el factor método, queda planteado como:

$$Y_{ikl} = \tau_i + \theta_k + \varepsilon_{ikl}$$

Dónde:

Y_{ikl} : Variable respuesta (Conteos de viabilidad)

θ_k : Efecto del microorganismo

ε_{ikl} : Errores residuales

τ_i : Efecto del tiempo

Estos datos confirman lo observado en las gráficas, que existen diferencias significativas de la viabilidad tanto durante el tiempo de estudio como por tipo de microorganismo de estudio. Para darle seguimiento al objetivo de verificar las variaciones de viabilidad en el tiempo se aplicó la prueba de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para ver la relación existente entre la cantidad de microorganismos promedio encontradas a los diferentes tiempos cuantificados. Los resultados de esta prueba se observan en la tabla N°11.

Tabla N°11. Resultados de la prueba LSD aplicada la viabilidad de los microorganismos conservados por el método L-Drying.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1.5 meses - 3 meses	*	-5.50333E11	1.44867E11
1.5 meses – Pre proceso	*	-2.49333E11	1.44867E11
1.5 meses - Post proceso		-1.15733E11	1.49618E11
3 meses - Preproceso	*	3.01E11	1.29573E11
3 meses - Post proceso	*	4.346E11	1.44867E11
Pre proceso - Post proceso		1.336E11	1.44867E11

* indica una diferencia significativa

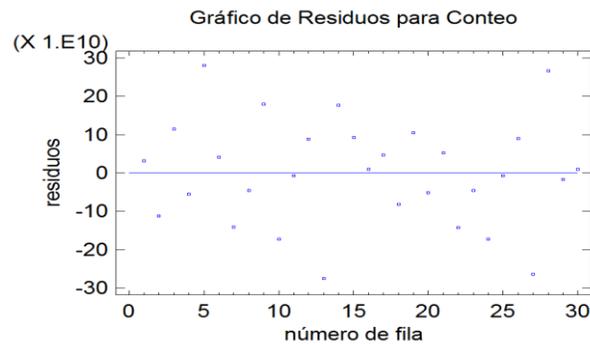


Figura N°18. Homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: tiempo microorganismo).

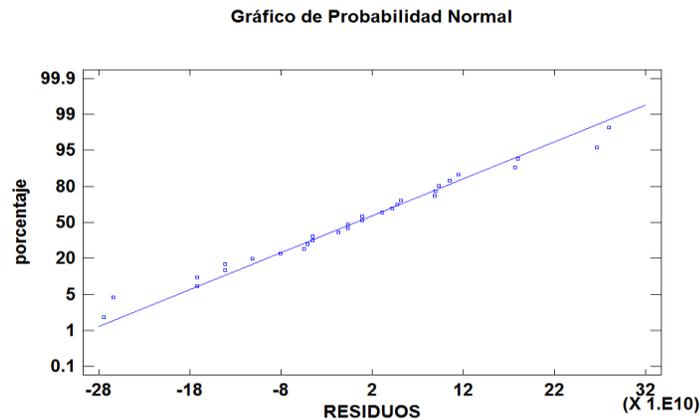


Figura N°19. Grafica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA (Factores: método, tiempo microorganismo).

Una ecuación representativa de los resultados de la prueba LSD se muestra a continuación:

$$\mu_{\text{preproceso}} = \mu_{\text{post proceso}} = \mu_{1.5 \text{ meses}} < \mu_{3 \text{ meses}}$$

La prueba de diferencia de medias mostró que la población de los últimos meses de muestreo es mayor a la población inicial e incluso mayor a la

población posterior al proceso, en otras palabras que los microorganismos se están reproduciendo.

La gráfica de viabilidad residual de los microorganismos conservados por este método (Figura N°20) confirma como se estableció en el párrafo anterior que los microorganismos en los tubos se están reproduciendo.

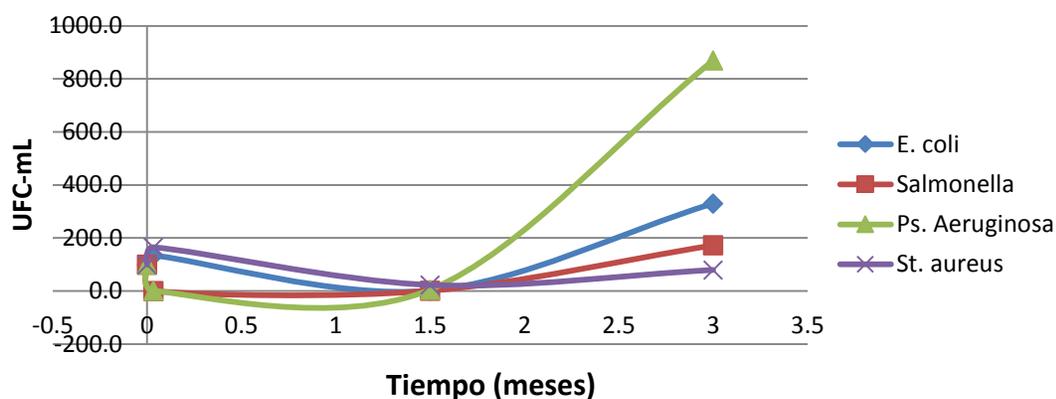


Figura N°20. Viabilidad residual de los microorganismos conservados por el método de L-Drying

Dados las diferentes dificultades encontradas durante la implementación del procedimiento se consideró la posibilidad de que el crecimiento en los tubos conservados por este método se debiera a la humedad final de estos. Mediciones de la humedad de los tubos conservados mostraron los datos indicados en la Tabla N°12.

Tabla N°12. Humedad relativa de los tubos correspondientes a los diferentes microorganismos conservados por el método de L-Drying.

Microorganismo	% de humedad
<i>St aureus</i>	17.249 ± 16.708
<i>Ps. aeruginosa</i>	14.763 ± 14.832
<i>E. coli</i>	47.952 ± 61.386
<i>Salmonella</i>	74.654 5.456

Los resultados de humedad indicaron una alta heterogeneidad en este parámetro, empezando desde niveles mínimos de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 80%. Estos niveles de humedad han sido reportados como niveles permisibles para el crecimiento de los microorganismos, lo cual a su vez puede también permitir mutaciones indeseables en cepas destinadas a ser utilizadas como referencia.

5.3.2 Viabilidad de los microorganismos por siembra en agar BHI.

Los resultados de viabilidad de las cepas conservadas por el método de agar BHI se observan en la Figura N°21.

Ya en la sección 3.3.1 se había mencionado una clara tendencia de disminución de la viabilidad presentada por los microorganismos conservados a través de este método. Los resultados del análisis de varianza (Tabla N°13) indican que hay diferencias significativas de viabilidad en los diferentes tiempos de estudio y por microorganismo ($P=0.00$, y $P=0.01$ respectivamente). Previo a la aplicación de este modelo se verificaron de nuevo los supuestos, como se muestra en las Figuras N°22 y 23.

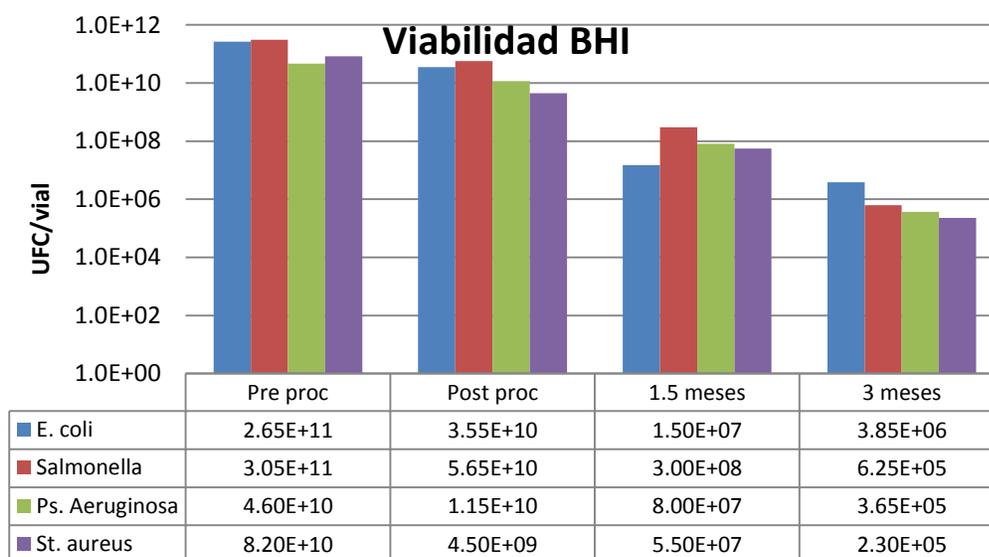


Figura N°21. Estudio de viabilidad de microorganismos conservados por siembra

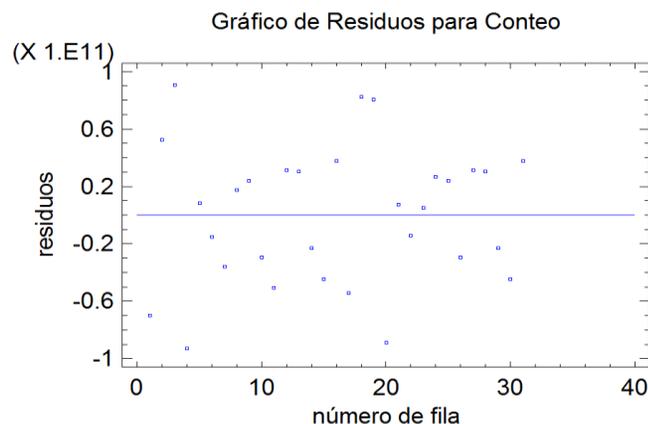


Figura N°22. Evaluación de homogeneidad de los residuos en la aplicación del modelo ANOVA al método BHI (Factores: tiempo microorganismo).

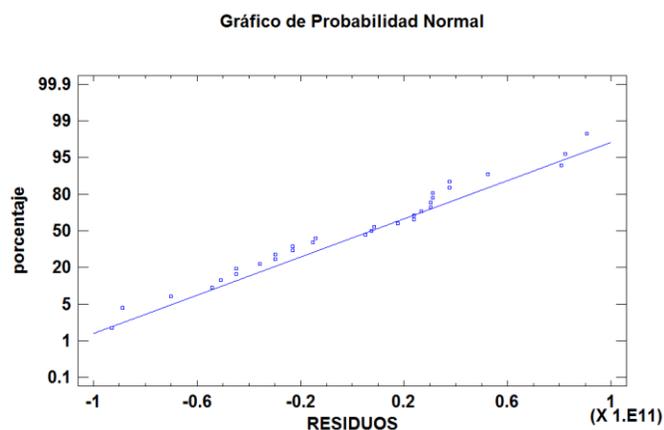


Figura N°23. Gráfica de distribución lineal de los errores en la aplicación del modelo ANOVA al método BHI (Factores: tiempo microorganismo).

Tabla N°13. Datos de análisis de varianza de los conteos realizados, respecto a los factores: Microorganismo y tiempo a un nivel de confianza de 95% para el método de conservación por siembra en agar BHI.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Microorganismo	4.17925E22	3	1.39308E22	4.01	0.0190
B:Tiempo	1.43244E23	3	4.7748E22	13.75	0.0000
RESIDUOS	8.33472E22	24	3.4728E21		
TOTAL (CORREGIDO)	2.73037E23	30			

Tabla N°14. Resultados de la prueba LSD aplicada la viabilidad de los microorganismos conservados por el método de conservación por siembra en agar BHI.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1.5 meses - 3 meses		6.90671E9	6.31991E10
1.5 meses – Pre proceso	*	-1.58342E11	6.31991E10
1.5 meses - Post proceso		-2.0092E10	6.31991E10
3 meses – Pre proceso	*	-1.65249E11	6.08134E10
3 meses - Post proceso		-2.69987E10	6.08134E10
Pre proceso - Post proceso	*	1.3825E11	6.08134E10

* indica una diferencia significativa.

Una ecuación representativa de los resultados de la prueba LSD se muestra a continuación:

$$\mu_{\text{preproceso}} > \mu_{\text{post proceso}} = \mu_{1.5 \text{ meses}} = \mu_{3 \text{ meses}}$$

The diagram consists of a horizontal line with a vertical tick mark on the left side. From this tick mark, a horizontal line extends to the right, ending at another vertical tick mark. Below this line, there is a greater-than sign (>) and an equals sign (=). A bracket connects the two tick marks, indicating that the difference between the pre-process mean and the post-process mean is significant, while the post-process mean is not significantly different from the 1.5-month and 3-month means.

Además de haber diferencias significativas, las diferencias de medias (Tabla N°14) indicaron que si bien hay reducción significativa de la viabilidad de los microorganismos debida a la aplicación del método de conservación, solamente durante el mes y medio posterior; por otro lado no hay diferencias significativas en la cantidad de microorganismos viables entre los tiempos de post-proceso, 1.5 meses y tres meses. El mantenimiento de la viabilidad durante los tres meses posteriores a la aplicación de método de conservación sugiere un buen comportamiento del método que apoya su utilización como método de conservación.

La gráfica de viabilidad residual de los microorganismos conservados por este método (Figura N°24) nos confirman las inferencias obtenidas mediante el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias; pero además nos permiten agregar una línea de tendencia exponencial, una ecuación y un coeficiente de correlación correspondiente. Los datos anteriores nos indicaron el ajuste de los datos al modelo exponencial y se utilizaron como una

herramienta predictiva para encontrar el tiempo al cual todavía será posible encontrar microorganismos viables en los tubos conservados.

Es importante observar que tres de los cuatro coeficientes de correlación obtenidos para las líneas de tendencia agregadas son mayores a 0.97 lo cual indica que más del 97% de los datos se ajusta al modelo. Solamente para la curva de viabilidad residual de *E. coli* se observó un coeficiente de correlación de 0.87, que para efectos de considerarse este como un estudio preliminar ofrece una perspectiva que representa bastante bien el comportamiento de los microorganismos bajo este método de conservación.

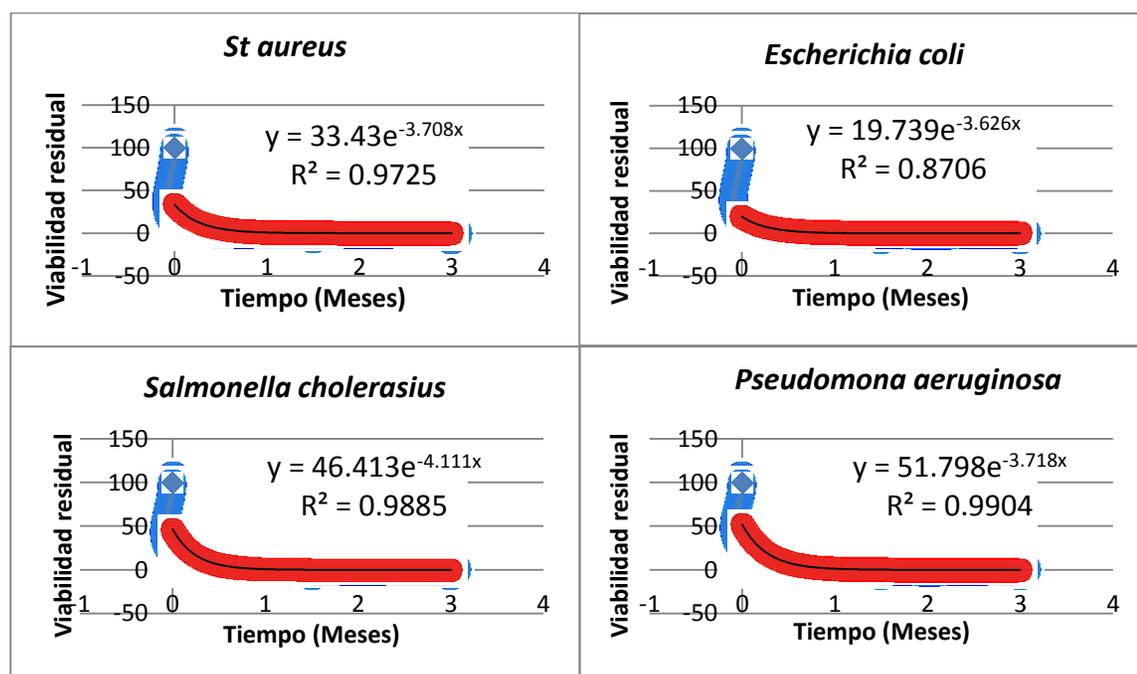


Figura N°24. Viabilidad residual de los microorganismos conservados por el método de siembra en agar BHI. La línea azul indica los datos obtenidos experimentalmente, y la línea roja indica la línea de tendencia agregada mediante el programa Excel® cuya ecuación y coeficiente de correlación se indican dentro de cada gráfica.

Al realizar el despeje de la ecuación obtenida de la línea de tendencia correspondiente a cada microorganismo se obtiene una expresión útil para predecir el tiempo en el cual bajo las condiciones de almacenamiento actuales de los tubos (25-27 °C) será posible recuperar al menos 100 UFC (0.0000001% de la población inicial) de los microorganismos. Los resultados obtenidos del despeje de ecuaciones (Tabla N°15) señalaron que en tiempos entre 4.8 y 5.4 meses todavía será posible recuperar microorganismos viables de tubos producidos mediante este método de conservación y bajo las condiciones de almacenamiento establecidas. Los datos de estabilidad bioquímica presentados en las siguientes secciones completan la información necesaria para establecer el nivel de utilidad de este sistema para la conservación de microorganismos de referencia en el laboratorio de microbiología.

Tabla N°15. Predicción del tiempo de la vida útil de los microorganismos conservados por el método de BHI

Microorganismo	Ecuación de predicción	T _{μ=100 UFC}
<i>E. coli</i>	$x = -\frac{\ln \frac{0.0000001}{19.739}}{3.626}$	5.26 meses
<i>Salmonella</i>	$x = -\frac{\ln \frac{0.0000001}{46.413}}{4.111}$	4.85 meses
<i>Ps. aeruginosa</i>	$x = -\frac{\ln \frac{0.0000001}{51.798}}{3.718}$	5.4 meses
<i>St. aureus</i>	$x = -\frac{\ln \frac{0.0000001}{33.43}}{3.708}$	5.29 meses

5.4 PUREZA DE MICROORGANISMOS

Las Tablas N°16 y 17 muestran los resultados de la verificación de pureza realizadas a los cultivos conservados así como los resultados esperados de la morfología microscópica de cada microorganismo. Los resultados confirmaron la presencia de los microorganismos de interés durante todas las

determinaciones realizadas. Se confirmó la presencia de las bacterias en estudio tanto en medios nutritivos como en selectivos, durante todos los tiempos de estudio, para ambos métodos de conservación.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la pureza microscópica durante la realización del estudio, con sus respectivos resultados esperados.

Tabla N°16. Resultados de los controles de pureza microscópica para las bacterias en estudio.

Microorganismo	Morfología característica	Morfología Microscópica (resultados)							
		LD Tiempo (meses)			BHI Tiempo (meses)				
		0	pre	1.5	3	0	pre	1.5	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos gram (+) en racimo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella cholerasius</i>	Bacilos cortos gram (-) no esporulados	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos cortos gram (-) no esporulados agrupados en cadenas cortas	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacilos gram (+) no esporulados	+	+	+	+	+	+	+	+

En algunas placas de recuento presentaron contaminación microbiológica, evidenciada por la presencia de colonias con morfologías diferentes a la de las bacterias conservadas, mientras que a nivel microscópico era difícil observar la contaminación por bacilos gram (-) con morfología microscópica similar a las bacterias en estudio. Sin embargo se logro discriminar a los bacilos gram negativos contaminantes por la presencia de esporas terminales en la estructura celular de los mismos. Se atribuyó esto al grado de contaminación presente en el laboratorio, verificado mediante la realización de controles a los cultivos Los cuales mostraban predominantemente contaminación por hongos filamentosos, colonias de color naranja puntiformes y colonias redondas de color crema, concordantes con la contaminación observada.

Tabla N°17. Resultados de bacterias en estudio respecto a la morfología macroscópica esperada en medios de promoción y selectivos.

Bacteria	Medio	Morfología macroscópica	Pre-proceso		Post-proceso		1.5 meses		3 meses	
			LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI
Staphylococcus aureus ATCC 6538	AN	Colonias puntiformes redondas, lisas, convexas y brillantes de color amarillo dorado.	+	+	+	+	+	+	+	+
	BPA	Colonias puntiformes negras con decoloración	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomona aeruginosa ATCC 9027	AN	Colonias mucoides, grandes de borde irregular y olor característico	+	+	+	+	+	+	+	+
	CET	Colonias mucoides que presentan pigmentación verdosa y olor característico	+	+	+	+	+	+	+	+
Escherichia coli ATCC 8739	AN	Colonias lisas, convexas y húmedas de superficie brillante y bordes lisos	+	+	+	+	+	+	+	+
	EMB	Colonias puntiformes húmedas y con coloración verde metálica característica	+	+	+	+	+	+	+	+
Salmonella typhimurium ATCC 14028	AN	Colonias grandes, lisas y húmedas	+	+	+	+	+	+	+	+
	XLD	Colonias negras de borde regular	+	+	+	+	+	+	+	+

CET: Agar cetrímide EMB: Agar EMB AN: Agar nutritivo XLD: Agar XLD

5.5 ESTABILIDAD BIOQUIMICA

Los resultados obtenidos en la caracterización de los cuatro microorganismos conservados por ambos métodos indican que todos estos mantuvieron sus características bioquímicas iniciales a lo largo de la investigación. Las pruebas API para las Enterobacterias: *Escherichia coli* y *Salmonella cholerasius*, se ajustaron a los patrones de comparación establecidos por la base de datos del sistema RapidONE 20E, confirmando la identidad de estos microorganismos (Tabla N°18), adicionalmente se realizó el conjunto de pruebas IMVIC a las enterobacterias analizadas (Tablas N°19 y 20), los resultados obtenidos mediante estas pruebas también identifican a los microorganismos evaluados como *Escherichia coli* y *Salmonella Spp* respectivamente, de acuerdo a lo descrito también en el manual de Bergey's⁽¹⁹⁾. Para las no Enterobacterias: *Staphilococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, los resultados obtenidos corresponden con lo indicado en las pruebas establecidas en el Manual de Bergey's de microbiología identificativa ⁽¹⁹⁾ (Tablas N°21 y 22).

Tabla N°18. Porcentaje de identificación para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 8739 en la prueba RapidOne

Microorganismo	Resultado pre- proceso de RapidOne (%)	Post-proceso		1.5 meses		3 meses	
		LD (%)	BHI (%)	LD (%)	BHI (%)	LD (%)	BHI (%)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	98.16	98.20	98.16	98.18	98.52	98.16	98.18
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>99.9	>99.9	99.96	>99.9	>99.9	>99.9	99.98

Tabla N°19. Resultados de pruebas bioquímicas IMVIC *Escherichia coli* 8739 por los métodos L-drying y BHI (TSI: Agar tres azucares y hierro; I: Indol; RM: Rojo de Metilo.VP; Voges Proskauer; C: Citrato; M: Movilidad).

Prueba Tiempo	RM		Movilidad		VP		Indol		TSI		Citrato		Agar EMB	
	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	LD	BHI	LD	BHI
Post-proceso	+	+	+	+	-	-	+	+	A/A	A/A	-	-	+	+
1.5 meses	+	+	+	+	-	-	+	+	A/A	A/A	-	-	+	+
3 meses	+	+	+	+	-	-	+	+	A/A	A/A	-	-	+	+
Resultado esperado	+		+		-		+		A/A		-		+	

Tabla N°20. Resultados de pruebas bioquímicas IMVIC para *Salmonella* por los métodos L-drying y BHI (TSI: Agar tres azucares y hierro; I: Indol; RM: Rojo de Metilo.VP; Voges Proskauer; C: Citrato; M: Movilidad).

Prueba Tiempo	RM		Movilidad		VP		Indol		TSI		Citrato		Agar BS	
	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD
Post-proceso	+	+	+	+	-	-	-	-	K/A, H2S, gas	K/A, H2S, gas	+	+	+	+
1.5 meses	+	+	+	+	-	-	-	-	K/A, H2S, gas	K/A, H2S, gas	+	+	+	+
3 meses	+	+	+	+	-	-	-	-	K/A, H2S, gas	K/A, H2S, gas	+	+	+	+
Resultado esperado	+		+		-		-		K/A, H2S, gas		+		+	

Además se realizaron pruebas complementarias utilizando el sistema INVIC para la identificación de enterobacterias, cuyos resultados concuerdan con las pruebas API realizadas a estos mismos cultivos.

Tabla N°21. Resultados de pruebas bioquímicas *Staphylococcus aureus* 6538 por método L-drying y BHI

Prueba Tiempo	Coagulasa		Agar Baird Parker		Catalasa		Agar Chapman	
	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD
Pre-proceso	+	+	+	+	+	+	+	+
Post-proceso	+	+	+	+	+	+	+	+
1.5 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
3 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
Resultado esperado.	+		+		+		+	

Tabla N°22. Resultados de pruebas bioquímicas *Pseudomona aeruginosa* 9027 por método L-drying y BHI.

Prueba Tiempo	Cetrimide		Nitratos		Crecimiento a 41°C		Oxidasa	
	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD	BHI	LD
Pre-proceso	+	+	+	+	+	+	+	+
Post-proceso	+	+	+	+	+	+	+	+
1.5 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
3 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
Resultado esperado.	+		+		+		+	

5.6 Manual de conservación de cepas.

Debido a que el procedimiento de conservación por siembra en agar BHI indicó en el estudio buena estabilidad (no reproducción) de los microorganismos, además de tratarse de un método más económico de conservación se elaboró el manual de conservación de cepas utilizando como punto básico este método. El manual incluye además procedimientos de verificación de la estabilidad de los microorganismos estudiados en este trabajo de graduación y los registros a llenar.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 Conclusiones

1. Se confirmó durante todas las etapas del estudio que las cepas bacterianas presentaban las características bioquímicas y morfológicas propias de los microorganismos en estudio
2. El método de L-drying (liquid drying) no se recomienda para la conservación de microorganismos bajo las condiciones del estudio, debido a las limitaciones del equipo con el que cuenta el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, ya que produce cultivos inestables en su viabilidad y un riesgo en la pérdida de sus propiedades bioquímicas.
3. El Método de conservación por agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) mostro una pérdida significativa en su viabilidad únicamente luego de la aplicación del método, posterior a esto, durante el periodo de evaluación del estudio y a las condiciones de temperatura de almacenamiento.
4. Los cultivos conservados por siembra en agar BHI mostraron una buena estabilidad en su viabilidad y características bioquímicas por lo que se propone este método para su implementación en la conservación de cepas de referencia bacterianas como las estudiadas para un laboratorio de control de calidad microbiológico de medicamentos, por periodos de tiempo menores a 3 meses o hasta 5 meses.

CAPITULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

7.0. Recomendaciones

1. Evaluar el método de conservación por BHI (Infusión Cerebro Corazón) durante un intervalo de tiempo mayor y así determinar el periodo máximo en el que el método podría lograr conservar las características de viabilidad deseadas de una colección de cepas bacterianas bajo las condiciones en las que se desarrolló la investigación, o bajo condiciones diferentes.
2. Realizar una evaluación del método de conservación L-Drying con una bomba de vacío de mayor capacidad con el fin de reducir el porcentaje de agua residual contenida en los viales conservados.
3. Implementar controles de temperatura y humedad relativa de las diferentes áreas que componen el laboratorio de microbiología para el conocimiento de las condiciones bajo las que opera el laboratorio, de tal forma que se asegure constancia tanto en las condiciones para el mantenimiento de las cepas como las condiciones bajo las que se realizan las pruebas.
4. Que el laboratorio pueda contar con un programa de monitoreo de carga microbiológica ambiental en las áreas de las que consta el laboratorio así como también del ambiente de las incubadoras usadas en los análisis para así realizar medidas correctivas de acuerdo al caso, lo cual es especialmente importante tanto para el programa de conservación de material de referencia como para la realización de las pruebas.
5. Realizar una revisión de los procedimientos de limpieza y sanitización de las áreas de trabajo del laboratorio de microbiología así como la distribución de los materiales e instrumentos contribuiría para evitar posibles fuentes de contaminación cruzada que afecte el programa de conservación de cepas de referencia y todas las pruebas analíticas realizadas en el laboratorio

Bibliografía

1. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). NSR 03.00.07:06 Normativa ISO 17025 Segunda Edición. ; 2005.
2. Convention. USP. Microbiological Best Laboratory Practices. In USP 30 NF 25. Rockville: The United States Pharmacopeial. The National Formulary; 2006.
3. Clontz L. Microbial limit and Bioburden Tests: Validation approaches and Global requirements. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2009.
4. Sly L. Maintenance and preservation of microbial cultures in a laboratory culture collection. Nota tecnica. Sydney, Australia: NATA; 1991. Report No.: #14.
5. Fernández MD, Federico U. Sitio de la catedra de Ingenieria Bioquimica de la Universidad Nacional de La PLata. [En Línea]. Valencia: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).; 2012 [citado 6 de Julio de 2012. Disponible en:catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicalyII/seminario3.doc .
6. Norris JR, W RD. L-drying. In Methods in Micborbiology. New York: Academic Press; 1970. p. 197-200.
7. Malik KA. A simplified liquid-drying method for the preservation of microorganisms sensitive to freezing and freeze-drying. Journal of Microbiology Methods. 1990; 12.
8. Voget C. Sito de la catedra de Ingenieria Bioquimica de La Universidad de La PLata. [En Línea].; 2012 [citado 16 de Julio de 2012. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicalyII/seminariostp/III-conservaciondecultivos.ppt> .
9. HM S. Media and Reagents. In Bacteriological Analysis Manual. Washington: U.S. Food and Drugs Administraion; 1995. p. 32.
10. Weng Aleman Z, Junco Diaz R, Diaz Rosa OE, Alvarez Molina I, Beltran

Diaz JR, Rodriguez Salazar MC. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente. Revista Cubana Higiene y Epidemiologia. 2005; 43(2).

11. Bueno R, Gallardo L. Preservacion de hongos filamentosos en agua destilada esteril. Revista Iberoamericana de micologia. 1998; 15(166-168).
12. de Vizcarrondo M, Gutierrez de Gamboa S. [Identificacion microbiana [Monografia en Internet].; Universidad Central de Venezuela 2008.
13. Jennie C. Hunter AB. Maintaining cultures for biotechnology and Industry San Diego, California: Academic Press; 1996.
14. Villicana Cortina RJ, G A, Luis J. Atlas Bacteriologico Mexico: Comarketing S.A. de C.V.; 2007.
15. Bergey DH. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Philladelphia, Pasadena: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
16. Crystall D. Chapter 15: The Analysis of Variance. [En Línea].; 2005 [citado 20 de Septiembre de 2012. Disponible en:
<http://www.slideshare.net/rwmiller/chapter15>
17. D. S. Quality Systems for Management of Microbial Collections. In Ch 5. Culture collections to improve the quality of Live, Proceedings of the eight International Congress or culture collections. The Netherlands; 1996.
18. ATCC. ATCC 16404 product description. [En Línea].; 2012 [citado 23 de Julio de 2012. Disponible en:
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=16404&Template=funqiYeast>
19. Morales Garcia YE, et a. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnologicos. BioTecnologia. 2010; 14(2).
20. Rodriguez Cavallini E et al; Bacteriologia general: Principios y practicas de laboratorio; Editorial UCR; Costa Rica 2005

Anexos

Anexo N° 1.

Tabla N°23 Tabla de la distribución F

1 - $\alpha = 0.95$

1 - $\alpha = P (F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

v_1 = grados de libertad del numerador

v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234

ANEXO N° 2. ESQUEMAS DE DILUCION

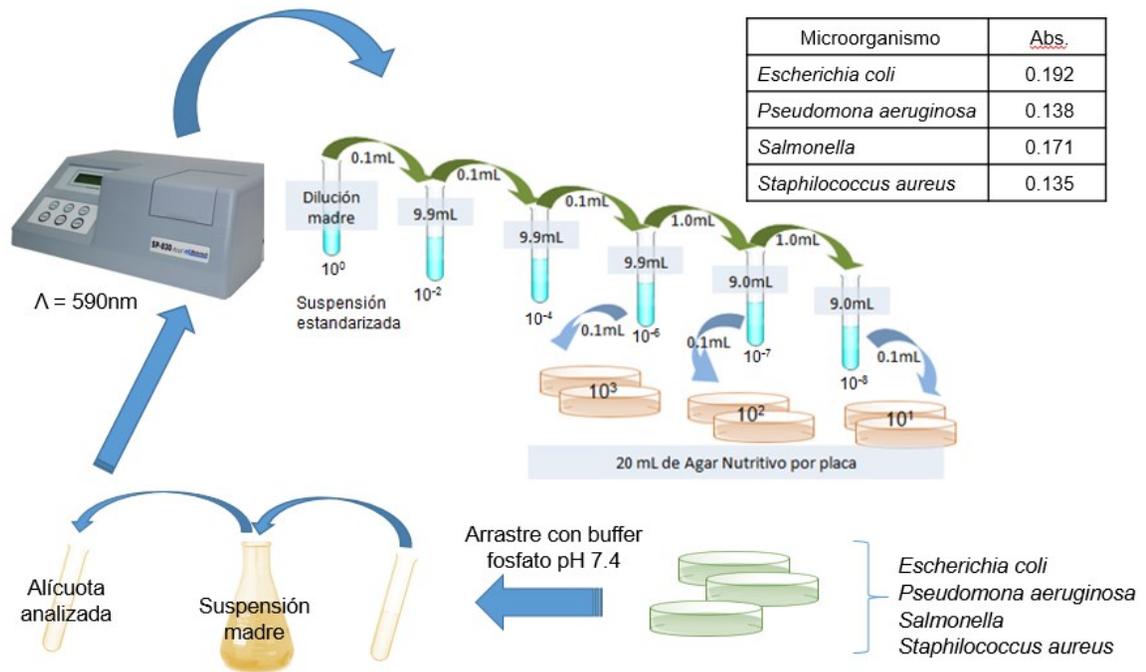


Figura N°6 Esquema de estandarización y verificación de viabilidad de cultivos.



Figura N°8 Procedimientos de reanimación para cultivos conservados por siembra en agar BHI y L-drying

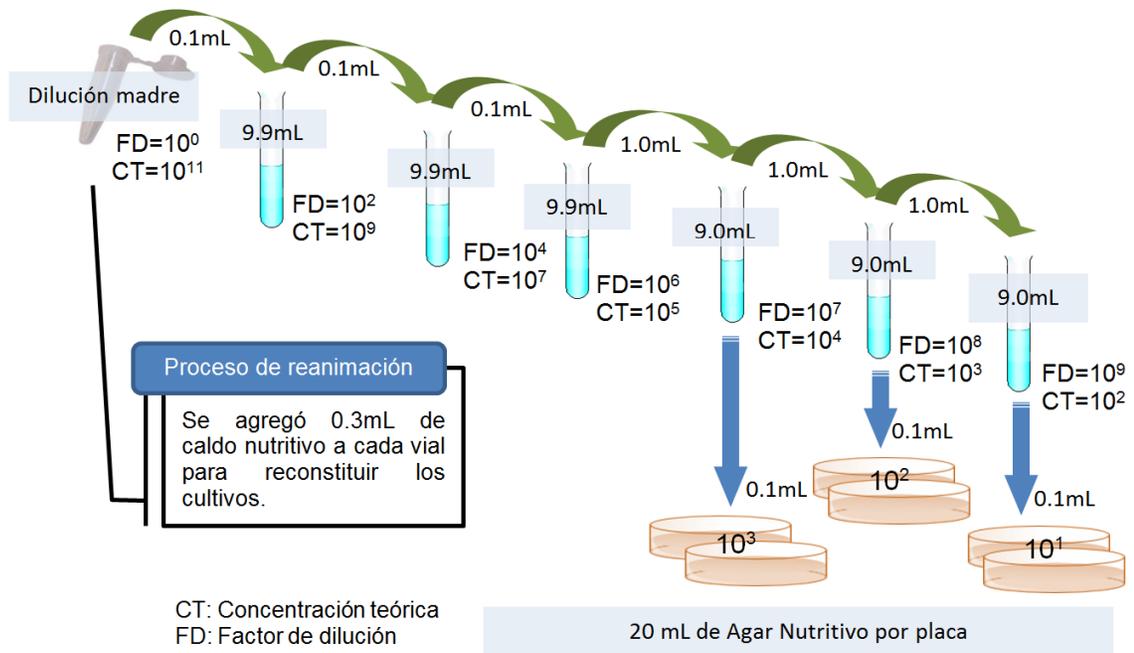


Figura N°9. Esquema de dilución y conteo para cultivos conservados por L-drying

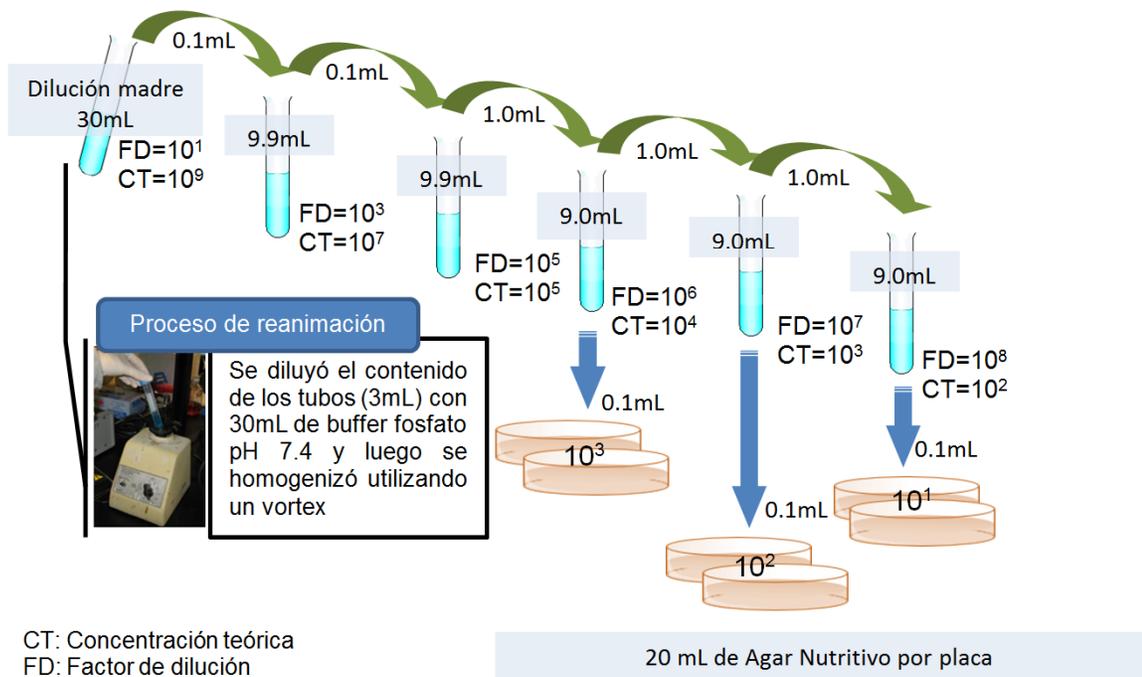


Figura N°10. Esquema de dilución y conteo para cultivos conservados por siembra en agar BHI

Anexo N° 3.

Tabla N°24 Fórmulas utilizadas para el cálculo de los valores P y F

$$\begin{aligned}
 SC_{Total} &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n y^2_{ijkl} - \frac{y^2 \dots}{N} & SC_A &= \frac{\sum_{i=1}^a y^2_{i\dots}}{bcn} - \frac{y^2 \dots}{N} \\
 SC_B &= \frac{\sum_{j=1}^b y^2_{\cdot j \dots}}{acn} - \frac{y^2 \dots}{N} & SC_C &= \frac{\sum_{k=1}^c y^2_{\dots k}}{abn} - \frac{y^2 \dots}{N} \\
 SC_{AB} &= \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y^2_{ij\dots}}{cn} - \frac{\sum_{i=1}^a y^2_{i\dots}}{bcn} - \frac{\sum_{j=1}^b y^2_{\cdot j\dots}}{acn} + \frac{y^2 \dots}{N} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y^2_{ij\dots}}{cn} - \frac{y^2 \dots}{N} - SC_A - SC_B \\
 SC_{AC} &= \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c y^2_{i\dots k}}{bn} - \frac{\sum_{i=1}^a y^2_{i\dots}}{bcn} - \frac{\sum_{k=1}^c y^2_{\dots k}}{abn} + \frac{y^2 \dots}{N} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c y^2_{i\dots k}}{bn} - \frac{y^2 \dots}{N} - SC_A - SC_C \\
 SC_{BC} &= \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y^2_{\cdot j \dots k}}{an} - \frac{\sum_{j=1}^b y^2_{\cdot j \dots}}{acn} - \frac{\sum_{k=1}^c y^2_{\dots k}}{abn} + \frac{y^2 \dots}{N} \\
 SC_{ABC} &= \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y^2_{ijk\dots}}{n} - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y^2_{ij\dots}}{cn} - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c y^2_{i\dots k}}{bn} - \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y^2_{\cdot j \dots k}}{an} + \frac{\sum_{i=1}^a y_{i\dots}}{bcn} + \\
 &\quad \frac{\sum_{j=1}^b y_{\cdot j \dots}}{acn} + \frac{\sum_{k=1}^c y_{\dots k}}{abn} - \frac{y^2 \dots}{N} \\
 &= \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y^2_{ijk\dots}}{n} - \frac{y^2 \dots}{N} - SC_A - SC_B - SC_C - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC} \\
 SC_{ERROR} &= SC_{Total} - SC_A - SC_B - SC_C - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC}
 \end{aligned}$$

Tabla N°24 Cuadro resumen de ecuaciones necesarias para el analisis de anova multifactorial.

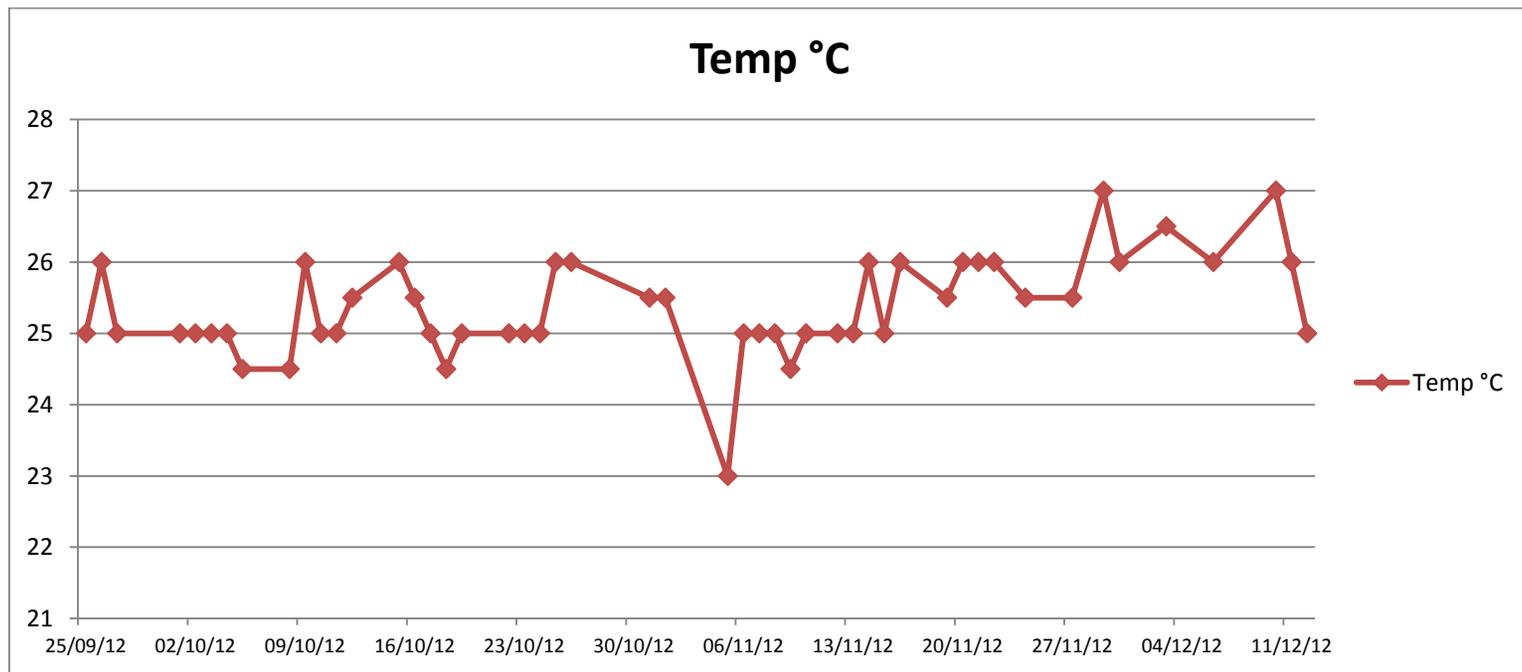
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	<i>F(Calculada)</i>
Factor A	SC_A	a-1	CM_A	$F_A = \frac{CM_A}{CM_{ERROR}}$
Factor B	SC_B	b-1	CM_B	$F_B = \frac{CM_B}{CM_{ERROR}}$
Factor C	SC_C	c-1	CM_C	$F_C = \frac{CM_C}{CM_{ERROR}}$
Interacción AB	SC_{AB}	(a-1)(b-1)	CM_{AB}	$F_{AB} = \frac{CM_{AB}}{CM_{ERROR}}$
Interacción AC	SC_{AC}	(a-1)(c-1)	CM_{AC}	$F_{AC} = \frac{CM_{AC}}{CM_{ERROR}}$
Interacción BC	SC_{BC}	(b-1)(c-1)	CM_{BC}	$F_{BC} = \frac{CM_{BC}}{CM_{ERROR}}$
Interacción ABC	SC_{ABC}	(a-1)(b-1)(c-1)	CM_{ABC}	$F_{ABC} = \frac{CM_{ABC}}{CM_{ERROR}}$
Error	SC_{ERROR}	abc(n-1)	CM_{ERROR}	
Total	SC_{Total}	N-1		

Anexo N°5

Tabla N° 25 Registros de temperaturas de almacenamiento para los cultivos conservados por siembra en agar BHI.

Fecha	Hora (am)	Temperatura °C	Hora (pm)	Temperatura °C
25/09/12	8:12	25	12:46	26
26/09/12	-----	-----	2:05	25
27/09/12	9:35	25	2:38	25
01/10/12	9:35	25	-----	-----
02/10/12	9:27	25	-----	-----
03/10/12	7:50	24.5	3:49	24.5
04/10/12	-----	-----	2:15	26
05/10/12	7:38	25	2:05	25
08/10/12	9:50	25.5	3:01	26
09/10/12	7:09	25.5	-----	-----
10/10/12	7:52	25	2:53	24.5
11/10/12	7:21	25	2:02	25
12/10/12	7:00	25	2:31	25
15/10/12	7:04	26	-----	-----
16/10/12	8:10	26	2:33	25.5
17/10/12	7:46	25.5	2:05	23
18/10/12	7:15	25	3:15	25
19/10/12	7:05	25	3:40	24.5
22/10/12	7:27	25	3:00	25
23/10/12	10:22	25	1:45	26
24/10/12	7:40	25	-----	-----
25/10/12	-----	-----	3:31	26
26/10/12	7:46	25.5	2:55	26
31/10/12	9:22	26	1:22	26
01/11/12	7:21	25.5	-----	-----
05/11/12	9:18	25.5	-----	-----
06/11/12	11:58	27	-----	-----
07/11/12	7:16	26	3:01	26.5
08/11/12	10:16	26	3:42	27
09/11/12	8:41	26	-----	-----
10/11/12	9:32	25	1:42	26.5
12/11/12	7:12	25.5	-----	-----
13/11/12	9:12	26	-----	-----
14/11/12	8:12	26	-----	-----
15/11/12	7:06	26	2:15	27
16/11/12	-----	-----	2:20	27
19/11/12	6:54	25.5	-----	-----
20/11/12	10:55	25	2:07	26.5
21/11/12	10:06	25	-----	-----
22/11/12	10:00	25	2:52	26
24/11/12	9:38	25	-----	-----
27/11/12	9:05	25	-----	-----
29/11/12	-----	-----	3:02	26
30/11/12	8:05	25	2:07	25
03/12/12	-----	-----	2:31	27
06/12/12	11:31	25.3	-----	-----
10/12/12	9:40	25	-----	-----
11/12/12	9:45	25.5	-----	-----
12/12/12	10:31	26.5	-----	-----

Figura N°29. Gráfico de temperaturas de almacenamiento para los cultivos conservados por siembra en agar BHI



Anexo N°. 5 Tablas de resultados de conteos.

Tabla N°26. Promedios de los conteos realizados a los cultivos conservados por L-Drying.

Mo	FD	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 1*FD	Conteo 2 *FD	Prom conteo	Método	Tiempo
<i>St. aureus</i>	1.00E+09	74	90	7.40E+10	9.00E+10	8.20E+10	BHI/LD	Inicial
<i>E. coli</i>	1.00E+10	25	28	2.50E+11	2.80E+11	2.65E+11	BHI/LD	Inicial
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+10	31	30	3.10E+11	3.00E+11	3.05E+11	BHI/LD	Inicial
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+09	44	48	4.40E+10	4.80E+10	4.60E+10	BHI/LD	Inicial
<i>St. aureus</i>	1.00E+10	27	N/D	2.70E+11	N/D	2.70E+11	LD	post proc
<i>E. coli</i>	1.00E+10	35	36	3.50E+11	3.60E+11	3.55E+11	LD	post proc
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+08	5	1	5.00E+08	1.00E+08	3.00E+08	LD	post proc
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+08	7	1	7.00E+08	1.00E+08	4.00E+08	LD	post proc
<i>St. aureus</i>	1.00E+09	37	N/D	3.70E+10	N/D	3.70E+10	LD	1.5 meses
<i>E. coli</i>	1.00E+08	31	33	3.10E+09	3.30E+09	3.20E+09	LD	1.5 meses
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+09	3	3	3.00E+09	3.00E+09	3.00E+09	LD	1.5 meses
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+08	20	26	2.00E+09	2.60E+09	2.30E+09	LD	1.5 meses
<i>St. aureus</i>	1.00E+10	6	7	6.00E+10	7.00E+10	6.50E+10	LD	3 meses
<i>E. coli</i>	1.00E+10	83	92	8.30E+11	9.20E+11	8.75E+11	LD	3 meses
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+10	58	47	5.80E+11	4.70E+11	5.25E+11	LD	3 meses
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+10	40	40	4.00E+11	4.00E+11	4.00E+11	LD	3 meses

Tabla N°27. Promedios de los conteos realizados a los cultivos conservados en agar BHI.

Mo	FD	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 1*FD	Conteo 2 *FD	Prom conteo	Método	Tiempo
<i>St. aureus</i>	1.00E+09	74	90	7.40E+10	9.00E+10	8.20E+10	BHI/LD	Inicial
<i>E. coli</i>	1.00E+10	25	28	2.50E+11	2.80E+11	2.65E+11	BHI/LD	Inicial
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+10	31	30	3.10E+11	3.00E+11	3.05E+11	BHI/LD	Inicial
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+09	44	48	4.40E+10	4.80E+10	4.60E+10	BHI/LD	Inicial
<i>St. aureus</i>	1.00E+09	5	4	5.00E+09	4.00E+09	4.50E+09	BHI	post proc
<i>E. coli</i>	1.00E+09	35	36	3.50E+10	3.60E+10	3.55E+10	BHI	post proc
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+09	36	77	3.60E+10	7.70E+10	5.65E+10	BHI	post proc
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+09	7	16	7.00E+09	1.60E+10	1.15E+10	BHI	post proc
<i>St. aureus</i>	1.00E+07	7	4	7.00E+07	4.00E+07	5.50E+07	BHI	1.5 meses
<i>E. coli</i>	1.00E+07	1	2	1.00E+07	2.00E+07	1.50E+07	BHI	1.5 meses
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+08	6	N/D	6.00E+08	N/D	6.00E+08	BHI	1.5 meses
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+07	8	8	8.00E+07	8.00E+07	8.00E+07	BHI	1.5 meses
<i>St. aureus</i>	1.00E+04	44	2	4.40E+05	2.00E+04	2.30E+05	BHI	3 meses
<i>E. coli</i>	1.00E+05	40	37	4.00E+06	3.70E+06	3.85E+06	BHI	3 meses
<i>Sal. cholerasius</i>	1.00E+04	46	79	4.60E+05	7.90E+05	6.25E+05	BHI	3 meses
<i>P. aeruginosa</i>	1.00E+04	29	44	2.90E+05	4.40E+05	3.65E+05	BHI	3 meses