

# Temas de actualidad

## La conservación de cepas microbianas

**María Dolores García López y Federico Uruburu Fernández**

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (València).

E-mail: [cect@uv.es](mailto:cect@uv.es) - <http://www.uv.es/cect>.

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general. Vamos a resumir estos métodos agrupándolos en tres apartados, que son: Métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.

### 1.- Métodos de elección o de conservación a largo plazo.

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: congelación y liofilización.

#### 1.1.- Conservación por congelación.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y 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. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, 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. Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

**1.1.1.- 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.

**1.1.2.- 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, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.

**1.1.3.- 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.

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 afectarse la viabilidad.

#### 1.1.4.- 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.

#### 1.2.- Conservación por liofilización.

Tampoco se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante la liofilización, que es un proceso suave. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. 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, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, pues la liofilización se hace en dos etapas y 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 liofilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo.

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, tenemos que hacer unas breves consideraciones sobre los que antes hemos mencionado para el caso de la congelación. La congelación puede hacerse rápida o lentamente, la primera sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Respecto a los crioprotectores, ya vimos que 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 liofilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo 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 glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o *chopped meat* (sin carne) para bacterias anaerobias, etc.

Los nuevos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

**1.2.1.- 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.

**1.2.2.- 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.

**1.2.3.- Temperatura durante la sublimación.** Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C.

**1.2.4.- 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.

**1.2.5.- Atmósfera del 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.

**1.2.6.- Condiciones de almacenamiento.** La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Los liofilos se deben guardar en la oscuridad.

## 2.- Métodos alternativos.

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

### 2.1.- Conservación por transferencia periódica.

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. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos 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 gene-

ralmente 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.

### 2.2.- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.

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 criotubos 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.

Los resultados obtenidos por la CECT en la conservación de microorganismos por este método muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es

#### Federico Uruburu Fernández y María Dolores García López

obtuvieron su Doctorado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, e iniciaron su trabajo de investigación en Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Son responsables de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, de la que el primero ha sido fundador y es Director.

**Federico Uruburu** ha trabajado también en el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC (Madrid), en el Instituto Politécnico Nacional Suizo (Zurich), en la Universidad de Salamanca y en la Universidad del País Vasco en Lejona. Actualmente es Catedrático de Microbiología en la



Universidad de Valencia y Director del Departamento de Microbiología y Ecología. Sus investigaciones han sido sobre ultraestructura, identificación y conservación de hongos filamentosos y levaduras y microbiología de la elaboración de vinos.



**María Dolores García** ha trabajado como investigadora en el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn y en la Universidad de Utrecht (Holanda), en la Universidad de Salamanca y en la Universidad del País Vasco en Lejona. Actualmente es Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Valencia. Sus trabajos versan sobre identificación y conservación de actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras.

buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo, etc.

### 3.- Métodos restringidos.

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. Los cuatro métodos que vamos a citar se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

#### 3.1.-Desecación en papel de filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (*L-Dry*) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células.

#### 3.2.- Desecación en suelo, arena, silicagel, etc.

Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método.

#### 3.3.- Desecación en bolitas de alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales.

#### 3.4.- Desecación en sal gorda para halobacterias.

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espon-

táneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible.

Por último, y a modo de resumen, unas consideraciones finales. Cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, cuando éstas se recuperan para hacer nuevos lotes para su conservación o para trabajar con ellas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés más o menos fuerte (sobre todo cuando se han conservado por liofilización) y por lo tanto no son adecuadas para ningún tipo de prueba. Primero habría que revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en un medio no selectivo, es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, y a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario. Igualmente hemos de tener presente que, dada la enorme diversidad microbiana, cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros, o será necesario tomar precauciones especiales en su conservación. Como ya dijimos al comienzo, no existe un método general de conservación de los microorganismos, aunque no resulta difícil determinar el más aconsejable en cada caso. La mayoría de microorganismos de interés sanitario pueden conservarse a largo plazo con los métodos generales de congelación y/o liofilización, y para periodos cortos pueden mantenerse vivos por alguno de los métodos alternativos si se hace en las condiciones adecuadas y bien controlados por un microbiólogo.

Con lo anteriormente expuesto pretendemos contestar a las numerosas preguntas que se plantean a la CECT sobre esta cuestión. Este artículo se ha confeccionado no solamente mediante una consulta bibliográfica que se puede ampliar con la completa bibliografía que se incluye al final, sino también gracias a la experiencia adquirida por el personal de la CECT a lo largo de los años, y los autores agradecen su información y consejos.

Finalmente, la CECT organiza cada año en el mes de Septiembre un curso teórico-práctico de 40 horas de duración repartidas en cinco días consecutivos sobre el tema "Conservación y control de cepas microbianas". Las plazas disponibles son 15, y en él los alumnos pueden aprender con más detalle lo que antes hemos resumido. La información sobre este curso y más detalles sobre la CECT se pueden consultar en su página web (<http://www.uv.es/cect>).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Beech FW, Davenport RR (1971) Isolation, purification and maintenance of yeasts. En: *Methods in Microbiology*, Vol. 4. Academic Press, London, pp. 153-182
2. Day JG, McLellan MR (1995) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press, Totowa (New Jersey)
3. Hatt H (1980) American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, Rockville
4. Hunter-Cevera JC, Belt A. (1996) Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, London
5. Juarros E, Tortajada C, García MD, Uruburu F. (1993) Storage of stock cultures of filamentous fungi at  $-80^{\circ}\text{C}$ : effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología SEM* 9:28-33
6. Kirsop BE (1980) The stability of industrial organisms. Commonwealth Mycological Institute, Kew
7. Kirsop BE, Doyle A (1991) Maintenance of microorganisms and cultures cells. Academic Press, London
8. Lapage SP, Shelton JE, Mitchell TG, Mackenzie AR (1970) Culture collection and the preservation of bacteria. En: *Methods in Microbiology*. Vol. 3. Academic Press, London, p. 135
9. Malik KA (1992) Technical information for culture collections curators in developing countries UNESCO/WFCC Education Committee, Braunschweig
10. Onions AHS (1971) Preservation of fungi. En: *Methods in Microbiology*. Vol. 4. Academic Press, London, pp. 113-151
11. Smith D, Onions AHS (1994) The preservation and maintenance of living fungi. International Mycological Institute, CAB International.