



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

---

# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

---

**Alumna:** Bromatóloga Carolina Daniela Bagatolli Garófoli

**Tesis de Grado:** LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO**

Alte Brown 500 - Chacras de Coria M5528AHB - Mendoza - Argentina

Tel: (54 261) 413-5010 - <http://www.fca.uncu.edu.ar/>

**2017**

---

# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

---

**Alumna:** Bromatóloga Carolina Daniela Bagatolli Garófoli <sup>(1)</sup>

**Directora:** Bioqca. Silvina Farrando <sup>(2)</sup>

**Co directora:** Lic. en Bromatología Nora Martinengo <sup>(3)</sup>

Contacto: [carolinabagatolli@gmail.com](mailto:carolinabagatolli@gmail.com) <sup>(1)</sup>, [sfarrando@fca.uncu.edu.ar](mailto:sfarrando@fca.uncu.edu.ar) <sup>(2)</sup>,  
[nmartin@fca.uncu.edu.ar](mailto:nmartin@fca.uncu.edu.ar) <sup>(3)</sup>

**Comité evaluador:** Dr. Iván Ciklic

Ing. Agr. Cora Dediol

Lic. en Bromatología María Laura Sánchez

## RESUMEN

La Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, posee una Colección de Cultivos Microbianos, que alberga microorganismos utilizados en docencia, servicios e investigación. Existe un método internacionalmente reconocido, CRYOBANK, en el que los microorganismos son conservados por congelación, en viales con “perlitas” sobre las cuales éstos son adheridos. Presenta la ventaja que ante la necesidad de activar un microorganismo una perla se siembra, en medio líquido o sólido, sin descongelar todo el vial; pero tiene la desventaja de su costo y su venta en cantidad no menor a 100 viales. Si bien en la práctica es frecuente la congelación utilizando mostacillas, en lugar de los viales comerciales, no hay datos sobre sus resultados. El objetivo de la tesis fue evaluar la efectividad de un método de conservación microbiano alternativo respecto al CRYOBANK. Para llevarlo a cabo se seleccionaron 12 cepas bacterianas, se activaron, se controló pureza y viabilidad, se conservaron por ambos métodos y al cabo de 24 horas, 1, 3, 6 y 15 meses se evaluó vialidad, pureza, porcentaje de recuperación y estabilidad de cada una. A los 15 meses el 83 % de las cepas conservadas no presentaron diferencias significativas en el recuento medio para ambos métodos. Todas se mantuvieron estables, puras y presentaron un porcentaje de recuperación mayor al 50 % a los 6 meses y el 67 % de ellas a los 15 meses. Por lo que el método de conservación alternativo permite preservar bacterias, al menos por el periodo de tiempo evaluado.

**PALABRAS CLAVES:** colecciones de cultivo, conservación bacterias, cultivos microbianos, criopreservación, validación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme siempre y permitirme culminar esta etapa.

A mis padres que han estado a mi lado, ayudándome a ser mejor cada día, dándome su amor y contención en todo momento.

A mi hermana por brindarme su cariño y compañía.

A Facundo por el amor, la paciencia y todo el apoyo que me ha dado en este trabajo.

A mi Directora de Tesis, Bioqca Silvina Farrando, quien me ayudó a crecer, me brindó sus conocimientos y estuvo en los momentos difíciles marcándome el camino.

A mi Co directora, Lic. Nora Martinengo, por su ayuda, experiencia y enseñanza.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, por contribuir a mi formación y ser una profesional de esta importante Casa de estudios.

## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN .....  | ii  |
| AGRADECIMIENTOS .....  | iii |
| ÍNDICE.....  | iv  |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| 1.1. INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO Y CONTENIDO DE LA MICROBIOLOGÍA .....                | 1   |
| 1.1.1. Evolución y diversidad microbiana .....                                     | 2   |
| 1.1.2. Desarrollo dominio Bacteria .....   | 4   |
| 1.1.3. Breve desarrollo histórico de la Microbiología .....                        | 6   |
| 1.2. LOS MICROORGANISMOS.....  | 6   |
| 1.2.1. Géneros bacterianos de importancia.....                                     | 7   |
| 1.2.2. Cultivo microbiano .....  | 11  |
| 1.2.2.1. Medios de cultivo .....   | 11  |
| 1.2.2.1.1. Elaboración de medios de cultivo .....                                  | 12  |
| 1.3. COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS.....                                      | 14  |
| 1.3.1. Historia y Actualidad .....   | 15  |
| 1.3.2. Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos..... | 18  |
| 1.3.2.1. Organización .....  | 19  |
| 1.3.3. Técnicas de preservación .....  | 22  |
| 1.4. PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....   | 24  |
| 1.4.1. Fundamentación del problema.....  | 24  |
| 1.4.2. Hipótesis General .....   | 25  |
| 1.4.3. Objetivo general.....   | 25  |
| 1.4.4. Objetivos específicos .....   | 25  |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 26  |
| 2.1. MATERIALES.....   | 26  |
| 2.2. CEPAS BACTERIANAS .....   | 26  |
| 2.3. MEDIOS DE CULTIVO .....   | 27  |
| 2.3.1. Agar para Recuento en Placa (PCA).....                                      | 27  |
| 2.3.2. Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS).....   | 27  |
| 2.3.3. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) .....                                 | 27  |
| 2.3.4. Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa- Sacarosa (Agar EMB) .....             | 27  |
| 2.3.5. Medio Mossel.....   | 27  |
| 2.3.6. Agar Baird Parker .....   | 27  |
| 2.3.7. Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC).....  | 28  |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.8. Agar Palcam base.....  | 28 |
| 2.4. ACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....   | 28 |
| 2.5. CONTROL DE PUREZA.....   | 28 |
| 2.5.1. Determinación de las características culturales.....                       | 28 |
| 2.5.2. Determinación de las características morfológicas.....                     | 28 |
| 2.5.3. Tinción de Gram .....  | 28 |
| 2.6. PROTOCOLO DE CONSERVACIÓN DE CEPAS .....                                     | 29 |
| 2.6.1. Conservación de bacterias por el Método CRYOBANK (MCbank) .....            | 29 |
| 2.6.2. Conservación de bacterias por el Método Alternativo (MA) .....             | 29 |
| 2.7. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN .....                                 | 29 |
| 2.7.1. Recuento de microorganismos viables.....                                   | 30 |
| 2.7.2. Control de pureza y estabilidad.....                                       | 30 |
| 2.7.3. Recuperación de las cepas conservadas.....                                 | 30 |
| 2.8. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO .....  | 30 |
| 2.8.1. Control de calidad de los medios de cultivo .....                          | 30 |
| 2.8.2. Control de la calidad microbiológica del aire en el lugar de trabajo ..... | 31 |
| 2.8.3. Control de esterilización.....   | 31 |
| 2.8.4. Control de estufas de cultivo .....  | 31 |
| 2.9. BIOSEGURIDAD .....   | 31 |
| 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....   | 32 |
| CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....  | 34 |
| 3.1. MEDIOS DE CULTIVO .....  | 34 |
| 3.1.1. Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS).....  | 34 |
| 3.1.2. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) .....                                | 34 |
| 3.1.3. Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa-Sacarosa (Agar EMB) .....             | 34 |
| 3.1.4. Medio Mossel.....  | 35 |
| 3.1.5. Agar Baird Parker .....  | 35 |
| 3.1.6. Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC) .....                                      | 35 |
| 3.1.7. Agar Palcam .....  | 36 |
| 3.2. CONTROL DE PUREZA.....   | 36 |
| 3.3. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO .....  | 41 |
| 3.3.1. Control de la calidad de medios de cultivo .....                           | 41 |
| 3.3.2. Control de la calidad microbiológica ambiental .....                       | 41 |
| 3.3.3. Control de esterilización.....   | 42 |
| 3.3.4. Control de estufas de cultivo .....  | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 44 |
| 3.4.1. Estadística Descriptiva.....   | 44 |
| 3.4.2. Comparación de las medias de cada método con respecto al tiempo..... | 45 |
| 3.4.2.1. <i>Escherichia coli</i> , cepa 2.....                              | 46 |
| 3.4.2.2. <i>Escherichia coli</i> , cepa 26.....                             | 46 |
| 3.4.2.3. Bacteria Láctica, cepa C.....                                      | 47 |
| 3.4.2.4. Bacteria Láctica, cepa L.....                                      | 47 |
| 3.4.2.5. <i>Salmonella</i> , cepa 11.....                                   | 48 |
| 3.4.2.6. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....                               | 48 |
| 3.4.2.7. <i>Listeria monocytogenes</i> , cepa 3.....                        | 49 |
| 3.4.2.8. Bacteria Láctica, cepa K.....                                      | 49 |
| 3.4.2.9. <i>Enterobacter</i> , cepa 10.....                                 | 50 |
| 3.4.2.10. <i>Salmonella</i> , cepa 12.....                                  | 50 |
| 3.4.2.11. <i>Bacillus subtilis</i> .....                                    | 51 |
| 3.4.2.12. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                | 51 |
| 3.4.3. Estadística Inferencial.....   | 52 |
| 3.5. VIABILIDAD DE LAS CEPAS CONSERVADAS.....                               | 56 |
| CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....  | 58 |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSION.....   | 60 |
| CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....   | 61 |
| ANEXOS.....   | 67 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN ribosomal.....   | 3  |
| Figura 2: Árbol de la vida según Carl Woese.....                                    | 4  |
| Figura 3: Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias.....        | 5  |
| Figura 4: Fermentación láctica Homofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995a).....   | 10 |
| Figura 5: Fermentación láctica Heterofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995a)..... | 10 |
| Figura 6: Cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido.....                    | 13 |
| Figura 7: Modelo de Liofilizador.....   | 23 |
| Figura 8: Caja de 64 viales.....  | 24 |
| Figura 9: Viales.....   | 24 |
| Figura 10: Materiales usados para la conservación de cepas bacterianas.....         | 26 |
| Figura 11: Eppendorf con mostacillas estériles.....                                 | 29 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 12: Recipiente para descartar tips contaminados .....               | 32 |
| Figura 13: Agar MRS, Bacterias Lácticas .....                              | 34 |
| Figura 14: Agar XLD, <i>Salmonella</i> .....                               | 34 |
| Figura 15: Agar EMB, <i>E. coli</i> .....                                  | 35 |
| Figura 16: Medio Mossel, <i>Bacillus subtilis</i> .....                    | 35 |
| Figura 17: Agar Mac Conkey Sorbitol, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ..... | 36 |
| Figura 18: Agar Palcam, <i>Listeria monocytogenes</i> .....                | 36 |
| Figura 19: Tinción de Gram y Tinción negativa o con Nigrosina .....        | 41 |
| Figura 20: Cajas de Petri para Recuento ambiental .....                    | 42 |
| Figura 21: Tiras indicadoras de esterilización .....                       | 43 |
| Figura 22: Agua de dilución después del proceso de esterilización .....    | 43 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no-patógenas .....                 | 11 |
| Tabla 2. Continente: ÁFRICA .....  | 17 |
| Tabla 3. Continente: AMÉRICA .....   | 17 |
| Tabla 4. Continente: ASIA .....  | 17 |
| Tabla 5. Continente: EUROPA .....  | 17 |
| Tabla 6. Continente: OCEANÍA .....   | 18 |
| Tabla 7. Tinción de Gram, características culturales, morfológicas y pruebas bioquímicas de las cepas en estudio .....       | 37 |
| Tabla 8. Análisis Descriptivo de cada cepa según método de conservación. ....  | 45 |
| Tabla 9. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano <i>E.coli</i> .....  | 52 |
| Tabla 10. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano Lácticas .....  | 53 |
| Tabla 11. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano <i>Salmonella</i> .....   | 54 |
| Tabla 12. Estadística Inferencial para <i>Enterobacter</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i> ..... | 55 |
| Tabla 13. Porcentaje de recuperación de células a los 6 y 15 meses.....  | 56 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1: Número de Colecciones de Cultivos registrados en diferentes países y regiones. ....                       | 16 |
| Gráfico 2: Distribución y cantidad de colecciones de cultivos en diferentes países y regiones de todo el mundo. .... | 16 |
| Gráfico 3: Recuento ambiental en 15 minutos .....  | 42 |
| Gráfico 4: Registro de temperatura de incubación a 28 °C .....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 5: Registro de temperatura de incubación a 37 °C .....   | 44 |
| Gráfico 6: Comportamiento de <i>E. coli</i> cepa 2, por ambos métodos con respecto al tiempo .....   | 46 |
| Gráfico 7: Comportamiento de <i>E. coli</i> cepa 26, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 46 |
| Gráfico 8: Comportamiento de BAL cepa C, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 47 |
| Gráfico 9: Comportamiento de BAL cepa L, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 47 |
| Gráfico 10: Comportamiento de <i>Salmonella</i> cepa 11, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 48 |
| Gráfico 11: Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7, por ambos métodos con respecto al tiempo .....   | 48 |
| Gráfico 12: Comportamiento de <i>Listeria</i> cepa 3, por ambos métodos con respecto al tiempo .....   | 49 |
| Gráfico 13: Comportamiento de BAL cepa K, por ambos métodos con respecto al tiempo .....   | 49 |
| Gráfico 14: Comportamiento de <i>Enterobacter</i> cepa 10, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 50 |
| Gráfico 15: Comportamiento de <i>Salmonella</i> cepa 12, por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 50 |
| Gráfico 16: Comportamiento de <i>Bacillus subtilis</i> , por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 51 |
| Gráfico 17: Comportamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , por ambos métodos con respecto al tiempo .....  | 51 |
| Gráfico 18: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo <i>E. coli</i> .....   | 52 |
| Gráfico 19: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo Lácticas .....   | 53 |
| Gráfico 20: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo <i>Salmonella</i> .....  | 54 |
| Gráfico 21: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos de <i>Enterobacter</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i> ..... | 55 |

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1. INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO Y CONTENIDO DE LA MICROBIOLOGÍA

La Microbiología es la ciencia que estudia a los microorganismos que constituyen un importante grupo de organismos primitivos y simples, la mayoría unicelulares microscópicos y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos, capaces de realizar innumerables procesos biológicos, que han surgido temprano en la evolución, pero que se han adaptado a las condiciones ambientales actuales. El grupo está integrado por las bacterias, algas, hongos, protozoos.

Los virus no se consideran microorganismos en sentido estricto, ya que no poseen estructura celular, presentan una sola molécula de ácido nucleico, carecen de actividad metabólica (excepto la enzima lisozima) y son incapaces de reproducirse por sí mismos. Se les denomina: entidades biológicas.

La Microbiología estudia:

- células vivas y su funcionamiento
- los microorganismos, importante grupo capaz de existencia independiente
- diversidad microbiana y evolución
- funciones en la biosfera, nuestro organismo y en el de los vegetales y animales.

Esta disciplina se divide en:

- Microbiología general o básica: herramienta para la comprensión de principios metabólicos generales, genética, división celular.

Se encarga del estudio de los microorganismos, su estructura, fisiología, clasificación, diversidad, procesos bioquímicos, crecimiento y su control.

- Microbiología aplicada: relacionada a problemas de la medicina, ambiente, industria, producción y conservación de alimentos, transformaciones de la materia orgánica y mineral en ecosistemas naturales, generación de energía, protección del ambiente, biotecnología. (Brock, 1998)

Los organismos cumplen con los 5 principios característicos de las células vivas:

1. Autoalimentación o nutrición: las células toman las sustancias químicas del ambiente, las transforman, liberan energía y productos de desecho.
2. Autoduplicación o desarrollo: las células son capaces de dirigir su propia síntesis. Al crecer, se dividen dando dos células cada una idéntica a la original.
3. Diferenciación: la mayor parte de las células pueden presentar cambios en su forma o función. La diferenciación suele ser parte del ciclo de vida celular: se forman estructuras especializadas comprometidas con la reproducción sexual, la dispersión, la sobrevivencia en condiciones desfavorables (esporas, cistos, etc).
4. Señalamiento químico: interactúan o se comunican con otras células, por señales químicas
5. Evolución: es la introducción de cambios hereditarios como resultado de la selección natural. Consecuencia de estos cambios (que ocurren a velocidad baja pero regular en todas las células) es la selección de los organismos mejor capacitados para vivir en determinado ambiente.

Los estudios con el microscopio electrónico permitieron reconocer diferencias en la organización subcelular de los organismos y confirmar la existencia de dos tipos de células: la eucariota (unidad estructural de animales, vegetales, protozoos, hongos y algas) y la procariota (característica de los organismos más simples, las bacterias, incluyendo entre éstas a las cianobacterias).

A pesar de la extraordinaria diversidad de células eucariotas, resultante de la especialización evolutiva de los distintos grupos, su arquitectura básica es común: compartimentalización por

sistemas membranosos (RE y Golgi), corrientes citoplasmáticas, mitocondrias y cloroplastos. El núcleo de los eucariotas está rodeado por una membrana nuclear, contiene varias moléculas de ADN y se divide por mitosis o por una completa reproducción sexual, que incluye fusión de células, formación de cigote diploide y segregación de células haploides luego de la meiosis.

La célula procariota, por el contrario, no posee membrana nuclear, posee una sola molécula de ADN y la división asexual es por bipartición, amitótica. La célula no está atravesada por membranas, no posee organelas, excepto sacos muy simples que alberguen a los pigmentos fotosintéticos y a veces vesículas de gas para flotar en el agua.

Los estudios a nivel de funciones celulares mostraron que estas diferencias estructurales son la expresión de mecanismos diferentes de:

- transmisión de la información genética
- tipos de metabolismo bioenergético
- procesos de entrada y salida de sustancias

Uno de los hechos más sorprendentes en la historia de la evolución debe ser sin duda la aparición de la primera célula eucariota. Se está lejos de comprender las causas de este gran salto en la evolución, sobre todo por la escasez de fósiles, que permitan reconocer intermediarios.

Ya desde la segunda mitad del siglo XIX se vislumbraban diferencias entre animales y vegetales con los organismos más simples, como las bacterias, hongos, algas y protozoos.

El zoólogo alemán Haeckel propuso en 1886 incluir a estos últimos organismos en un nuevo reino, el de los Protistas: integrado por organismos muy simples, la mayoría unicelulares, microscópicos, y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos (tubos con paredes rígidas con citoplasma y núcleos que fluyen libremente), conocidos vulgarmente como microorganismos.

No se diferencian en tejidos ni órganos, ni presentan especialización funcional, excepto, tal vez, para la reproducción.

A los virus les faltan muchos de los atributos de las células entre los cuales el más importante es que no son sistemas abiertos dinámicos. Una partícula viral es una estructura estática, incapaz de cambiar o reponer sus partes. Carecen de organización celular, de capacidad metabólica y de autoduplicación, no se los considera microorganismos, sino entidades biológicas y serán tratados en el capítulo de genética de procariotas, por el rol que ejercen en la transferencia de material genético. (Frioni, 2005)

### 1.1.1. Evolución y diversidad microbiana

Se calcula que el planeta Tierra tiene una antigüedad de 4.600 millones de años y se han descubierto restos fósiles de células bacterianas de unos 3.500 a 3.800 millones de años, por lo que se infiere que la vida procariota surgió poco después del enfriamiento terrestre.

Se postula a un hongo hemiascomicete como el primer organismo eucariota, que fue adquiriendo los 22 caracteres universalmente presentes en los eucariotas y ausentes en los procariotas, originado a partir de una bacteria aerobia. Esta hipótesis se contradice con la creencia general de que este organismo primitivo fuera una cianobacteria. Estas bacterias y la fotosíntesis productora de oxígeno se desarrollaron probablemente hace unos 2.500 a 3.000 millones de años. La diversidad microbiana aumentó en forma notable luego de la aparición del O<sub>2</sub>.

La figura 1 muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN ribosomal. Desde el punto de vista evolutivo los organismos se pueden dividir en tres grupos principales: arqueobacterias, eubacterias y eucariotas.

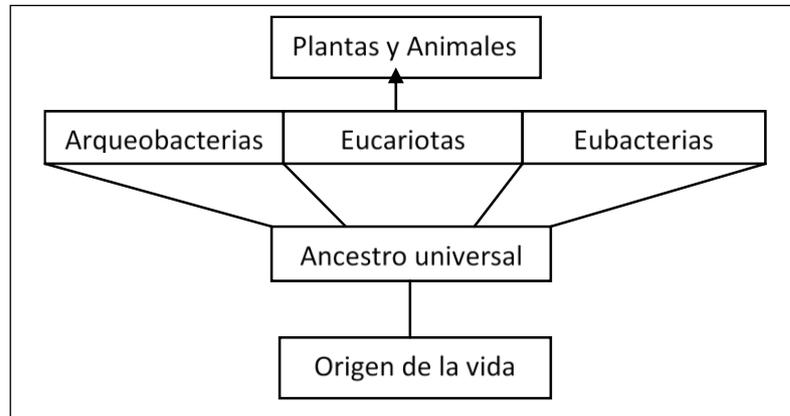


Figura 1: Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN ribosomal

Aunque las eubacterias y las arqueobacterias son procariotas, desde un punto de vista evolutivo no están más estrechamente relacionadas entre sí como lo están con los eucariotas.

Las arqueobacterias (Archaeae) comprenden un grupo muy primitivo que incluye organismos halófitos y termófilos extremos. Entre ellas se encuentran las bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas.

Parecería que los tres grupos bacterianos surgieron temprano en la historia de la tierra a partir de un organismo primitivo común, el «ancestro universal».

Debido a que las células de los animales y de las plantas son eucariotas, se ha considerado en forma general que han derivado de algún tipo de microorganismo, en tanto que los procariotas representan una rama que nunca superó la etapa microbiana. (Frioni, 2005)

Los estudios sobre las secuencias del ARN ribosomal en células procariotas sugiere una separación temprana de estos organismos. La figura 2 presenta el arreglo según estos criterios basados en la organización genética. De acuerdo al Árbol de la Vida de Woese, microbiólogo creador de la nueva taxonomía molecular basada en la comparación entre especies de la fracción 16s del ARN ribosomal, se proponen 3 dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, en los que se incluye a todos los seres vivos, como se muestra en la figura 2:

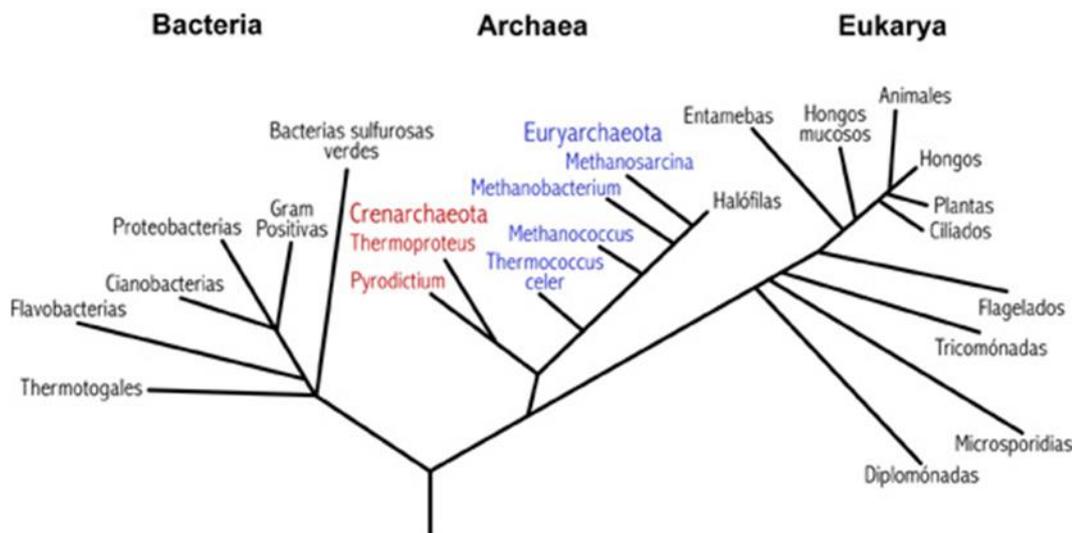


Figura 2: Árbol de la vida según Carl Woese

Los dominios *Archaea* y *Bacteria* corresponden a las células procariotas, una de cuyas características es la de carecer de membrana nuclear. Con base en el estudio de fósiles y modelos, se calcula que emergieron hace unos 3,6 - 4 mil millones de años. Su importancia radica en el hecho de haber desarrollado una pared celular o membrana externa que les confirió, desde el principio, autonomía y protección con respecto a su medio ambiente. Desde entonces constituyeron la forma de vida más abundante en el planeta en términos de biomasa y número de especies.

A pesar de su menor complejidad en relación a *Eucarya*, los integrantes de los dominios *Archeae* y *Bacteria* pueden vivir en hábitats extremos: se les encuentra en las profundidades de la Tierra, sobreviviendo gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado en los sedimentos y en las profundas fuentes hidrotermales submarinas.

Se acepta la aparición del dominio *Eukarya*, con membrana nuclear y orgánulos más desarrollados, desde hace unos dos mil millones de años; de este dominio derivan todos los organismos eucariontes uni y multicelulares.

### 1.1.2. Desarrollo dominio Bacteria

Las bacterias son células procariotas cuya estructura interna es muy simple, presentando como componentes básicos una pared celular que proporciona rigidez estructural, la membrana celular, que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva y el interior celular o citoplasma que contiene disueltas macromoléculas, iones inorgánicos y ribosomas, que son estructuras donde se sintetizan las proteínas; además se encuentra allí el material genético denominado nucleóide, el cual carece de membrana. El material genético de la célula bacteriana está formado por una hebra doble de ADN circular. Muchas bacterias poseen además pequeñas moléculas de ADN extracromosomal, circular, llamados plásmidos, que llevan información genética no esencial en la reproducción. Estos plásmidos pueden transferirse de una bacteria a otra mediante un mecanismo de intercambio genético denominado conjugación. Otros mecanismos por los cuales la bacteria puede intercambiar información genética son la transducción, en la que se transfiere ADN por virus bacterianos y la transformación, en la que el ADN pasa al interior de la célula bacteriana directamente desde el medio.

Presentan una morfología variada, comúnmente pueden poseer forma esférica (cocos) o bacilar, pero existe otras formas menos frecuentes como en forma de coma, estrella, espirilos, etc., figura 3.

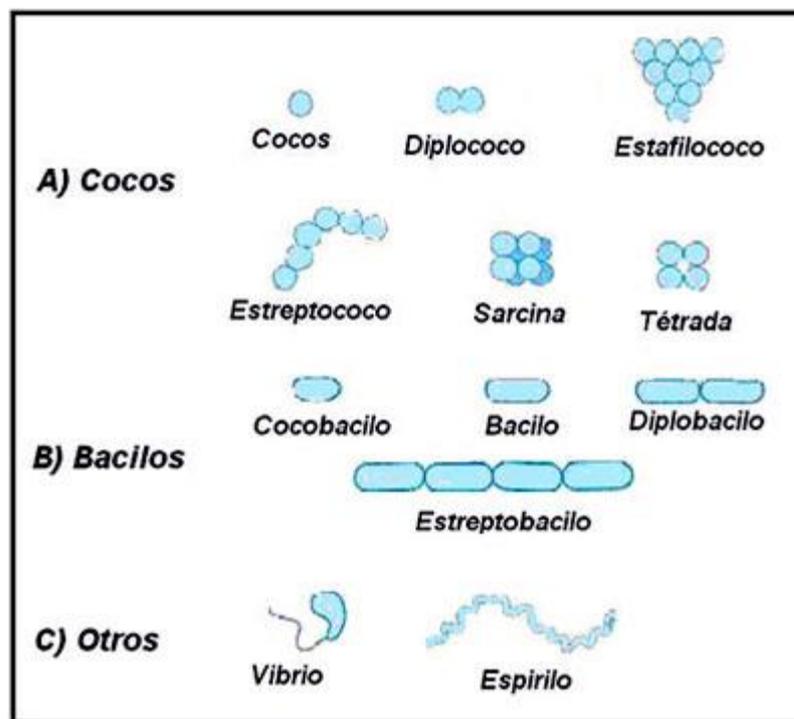


Figura 3: Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias

Según su agrupación pueden ser en aislados, diplo, en cadena, tétradas, en racimos, etc. Según como se los observa en la tinción de Gram pueden ser Gram-positivos si se observan violetas o Gram-negativos si se observan color rosado.

En cuanto al tamaño las bacterias presentan gran diversidad, en el caso de las esféricas, en promedio pueden presentar 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que los bacilos pueden presentar 1,5 de ancho por 6  $\mu\text{m}$  de largo.

Las células bacterianas se dividen por fisión binaria, proceso por el cual el material genético se duplica y la bacteria se alarga hasta alcanzar aproximadamente dos veces su longitud original y luego se forma un tabique que separa a las dos células hijas idénticas a la que le dio origen. El tiempo transcurrido en el proceso se llama tiempo de generación. Este valor es muy variable y depende de muchos factores, tanto nutricionales como genéticos; bajo las mejores condiciones nutritivas algunas bacterias se dividen cada 20 minutos. En este caso, si se dividen una vez cada 30 minutos, transcurridas 15 horas, una sola célula habrá dado lugar a unos mil millones de descendientes. Estas agrupaciones, llamadas colonias, son observables a simple vista sobre un medio sólido. En condiciones adversas, algunos géneros bacterianos pueden formar endosporas, que son formas de estado latente de la célula que permiten a ésta resistir las condiciones extremas de temperatura, humedad, falta de nutrientes, etc. como es el caso de *Bacillus* y *Clostridium*.

La tipificación de las bacterias se basa en el estudio de sus características mediante técnicas que oscilan entre las más sencillas tinciones, tal como la tinción de Gram, características bioquímicas y los más complejos estudios moleculares. Algunas propiedades genéticas y fisiológicas constituyen herramientas utilizadas para definir características de las cepas, como los serotipos y biotipos, determinación de especies en algunos grupos de bacterias, producción de toxinas. Los

métodos más sensibles se basan en el análisis del material genético. Cabe mencionar que éstos han diversificado sus objetivos; se emplean en la identificación de subgrupos de genes esenciales para el crecimiento, colonización, adhesión e invasión bacterianos (un ejemplo es el IVET - siglas de "in vivo expression technology"), desarrollada para seleccionar los genes activos únicamente durante la infección).

### 1.1.3. Breve desarrollo histórico de la Microbiología

- 1660: Robert Hooke describe estructuras de hongos
- 1632-1723: Anton van Leeuwenhoek, Alemania, publica dibujos de microorganismos vistos por un microscopio simple, con un solo lente (300 aumentos)
- Siglo XIX: Desarrollo de microscopios más potentes, poder separador 0,2 mm
- Segunda mitad siglo XIX: desarrollo acelerado de la Microbiología

Discusiones sobre dos temas fundamentales: ¿Existe la generación espontánea? y ¿cuál es la naturaleza de las enfermedades contagiosas?

- 1822-1895 Luis Pasteur en Francia, determinó la naturaleza microbiana de contaminaciones de infusiones, el metabolismo anaerobio, la inmunización
- 1876: Robert Koch en Alemania: los microorganismos como causantes de enfermedad del ganado provocado por *Bacillus anthracis* (antrax)

Postulados de Koch (Brock, 1998)

- El microorganismo causal debe estar presente en cada caso de enfermedad pero ausente en organismos sanos.
- El agente infeccioso debe poder aislarse en cultivo puro.
- Debe ser capaz de reproducir los síntomas de la enfermedad al inocularse en una planta o animal sano.
- Debe poder reaislarse en cultivo puro a partir del huésped enfermo y reconocerse idéntico al primer aislamiento.
- 1886: Haeckel en Alemania: se propone el Reino de los Protistas. John Tyndall en Inglaterra, endosporas resistentes al calor: técnica de esterilización por calor fraccionado (tindalización)

Ferdinand Cohn en Alemania: Métodos de esterilización más eficaces

- 1928: Griffith: Descubrimiento de la transformación
- 1933: Primer Microscopio electrónico de transmisión
- 1953: Estructura doble hélice del ADN - Watson y Crick
- 1977: Reconocimiento de Archeobacterias como grupo
- 1984: Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa
- 1986: Primera vacuna producida por Ingeniería Genética
- 1996: Se obtiene la secuencia del genoma de *Haemophilus influenzae*

Hasta la fecha han ocurrido innumerables avances en Biología Molecular, Biotecnología, incluida la secuenciación del genoma humano, a la que han contribuido los microorganismos. (Frioni, 2005)

## 1.2. LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos son diminutos seres vivos que individualmente son demasiado pequeños como para verlos a simple vista. En este grupo se incluyen las bacterias, hongos (levaduras y hongos filamentosos), virus, protozoos y algas microscópicas.

Por lo general estos pequeños organismos se asocian con infecciones, enfermedades, o deterioro de alimentos. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos contribuyen de una forma crucial en el bienestar de la Tierra ayudando a mantener el equilibrio de los organismos vivos y productos

químicos en nuestro medio ambiente. En el agua dulce y salada son la base de la cadena alimentaria en océanos, lagos y ríos; mientras que en el suelo destruyen los productos de desecho e incorporan el gas nitrógeno del aire en compuestos orgánicos, así como reciclan los productos químicos en el suelo, agua y aire; ciertas bacterias y algas juegan un papel importante en la fotosíntesis, que es un proceso que genera nutrientes y oxígeno a partir de luz solar, siendo un proceso crítico para el mantenimiento de la vida sobre la Tierra; los hombres y algunos animales dependen de las bacterias que habitan en sus intestinos para realizar la digestión y síntesis de algunas vitaminas como son la K y algunas del complejo B. Los microorganismos también tienen aplicaciones industriales ya que se utilizan en la síntesis de productos químicos como son acetona, ácidos orgánicos, enzimas, alcohol y muchos medicamentos.

La industria alimentaria usa microorganismos en la producción de vinagre, bebidas alcohólicas, aceitunas, manteca, queso y pan. Además, las bacterias y otros microorganismos pueden ser manipulados para producir sustancias que ellos normalmente no sintetizan (Ingeniería genética), las bacterias pueden producir importantes sustancias terapéuticas como insulina, hormona de crecimiento humana e interferón. (Mateos, P.)

### 1.2.1. Géneros bacterianos de importancia

Algunos géneros de importancia en Microbiología de los Alimentos y Microbiología Agrícola se describen a continuación:

- *Escherichia coli*: Son bacilos cortos Gram-negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas. Típicamente, la especie es Rojo Metilo positivo, Voges-Proskauer negativo, no crece en el medio de citrato de Simmons y la producción de Indol es positiva en la mayoría de las cepas. Se pueden diferenciar serológicamente unas de otras en base a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Pertenece a la microbiota normal del tracto intestinal de animales.

Sin embargo existen cepas patógenas tales como la *E. coli* enteropatógena (EPEC) que causa una lesión característica, que implica la destrucción de las microvellosidades sin que exista otro indicio de invasión de los tejidos.

*E. coli* O157:H7: es una cepa perteneciente a las *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). Fue identificado por primera vez como patógeno en 1982, cuando se asoció a dos brotes de colitis hemorrágica. Han sido descritos muchos brotes posteriores, que con frecuencia se relacionaban con el consumo de carne picada de vacuno insuficientemente cocida. *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuente dentro de las EHEC.

En el mecanismo de patogenicidad de EHEC participa una Verotoxina (por ser tóxica para las células Vero del riñón de mono verde africano) o toxina Shiga; se han hallado dos tipos de verotoxinas, *Verotoxina 1* (VT1) y *Verotoxina 2* (VT2), cuyo mecanismo de acción propuesto es que la subunidades B de la toxina se fija a los receptores de glucolípidos existentes en la superficie de la célula y la subunidad A es ingresada a la célula y se une al ribosoma 60S para inhibir la síntesis de proteínas y provocar la muerte celular.

- *Enterobacter sp.*: pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas. La mayoría de los enterobacter son Voges-Proskauer positivo, citrato de Simmons positivo e Indol negativo.

- *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*): bacilos cortos, Gram-positivos, asporógenos y anaerobios facultativos. Accidentalmente originan formas cocoides o células aisladas de 10 µm de longitud. Son móviles a 25 °C, mostrando una característica movilidad de “volteo”, pero no son móviles a 35 °C. Las colonias tienen un aspecto característico gris-azulado, que cambia a azul-verde cuando se observan con luz oblicua (iluminación de Henry) (Henry, 1993).

*L. monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de hospedadores animales y en medios nutritivos muy simples. Cuando infecta a los animales o a las personas, se multiplica intracelularmente. Parece ser que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas, pero todas las cepas patógenas son hemolíticas y la producción de hemolisina es una de las propiedades asociadas a la patogenicidad. Otros factores asociados con la patogenicidad son la producción de una proteína de 60.000 Da y de una fosfolipasa.

No hay acuerdo con respecto a la información de la dosis infecciosa mínima, aunque generalmente se cree que es relativamente elevada (> 100 células viables). La infección generalmente se produce a través del intestino y el periodo de incubación varía desde aproximadamente dos días hasta seis semanas. *L. monocytogenes* puede ser detectada en las heces de un porcentaje de la población humana sana, así como en los animales, en los que parece ser que es parte integrante de la microbiota normal.

- *Salmonella*: Son bacilos cortos de 0,7 - 1,5 x 2 - 5 µm, Gram-negativos no formadores de endosporas, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen. Son móviles debido a sus flagelos peritricos, con excepción de la serovariedad Gallinarum-Pullorum. Utilizan el citrato como única fuente de carbono, pero no utilizan lactosa ni sacarosa, decarboxilan lisina y pueden producir sulfuro de hidrógeno, son catalasa-positivos, oxidasa-negativo, reducen el nitrato a nitrito, entre otros caracteres. La reacción del Rojo de Metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la prueba del Indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNAsa ni lipasa. El contenido de G + C del DNA es de 50 - 53 moles %. Las salmonellas pueden albergar fagos atenuados o plásmidos que codifican los caracteres metabólicos que se utilizan en la identificación (por ejemplo, la producción de H<sub>2</sub>S, las fermentaciones de la lactosa o de la sacarosa).

La nomenclatura de *Salmonella* presenta algunas controversias, frecuentemente se utiliza la recomendada por el Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud en el Instituto Pasteur (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*) que acorde con los hallazgos genéticos describe dos especies distintas: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, dividida esta última en 6 subespecies: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV), indica (VI), que se diferencian por sus características bioquímicas y genéticas. Cada subespecie contiene a su vez varias serovariedades basadas en los antígenos O y H definidas por su fórmula antigénica. *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* son en la actualidad serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie enterica.

Las serovariedades adaptadas a determinados hospedadores han causado abortos y enfermedades septicémicas agudas, pero otros tipos causaron diarrea. Los portadores asintomáticos excretan salmonellas por las heces. Las salmonellas suelen estar localizadas en el tracto alimentario, pero se pueden encontrar en los ganglios linfáticos (especialmente en los mesentéricos), en el hígado, en la vesícula biliar, en los riñones, en el bazo y en el ovario. Las salmonellas zoonóticas, tal como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, invaden la luz del intestino delgado, donde se multiplican. Después, atraviesan el íleon y en menos grado el colon, donde se

produce una reacción inflamatoria. Los folículos linfáticos pueden aumentar el tamaño y se pueden ulcerar. Los ganglios mesentéricos con frecuencia se inflaman. A veces, las salmonellas atraviesan las barreras mucosa y linfática, llegan a la corriente sanguínea y originan abscesos en varios tejidos.

La dosis infectiva es alta y la investigación de algunos brotes ha sugerido que en los alimentos implicados hubiese una gran cantidad de salmonellas, por una manipulación y almacenamiento de modo inadecuado. Sin embargo, en algunos alimentos implicados epidemiológicamente se han encontrado pequeñas cantidades (por ejemplo <100/g) de salmonellas (D'Aoust et al., 1975; D'Aoust y Pivnick, 1976; Gangarosa, 1978; Blaser y Newman, 1982; Subcomité, 1985; Silliker y Gabis, 1986; Hockin et al., 1989). Por ejemplo 1000 células de *S. Typhimurium* en helado puro a base de huevo (Armstrong, 1964)

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): es la especie tipo del género *Staphylococcus*, que se presenta en forma de cocos, Gram-positivos, catalasa-positivos que se dividen en más de un plano para formar racimos tridimensionales de células. Desde el punto de vista morfológico, *Staphylococcus* crece en anaerobiosis y muestra un metabolismo anaerobio facultativo. La taxonomía de los estafilococos ha experimentado un cambio en los últimos veinte años. La diferenciación de especies está amparada por la homología del DNA y por los estudios inmunoquímicos; por lo que se refiere a las descripciones y a las características de las especies. Además, en base a pruebas bioquímicas y a patrones de resistencia, *S. aureus* se puede dividir en varios biotipos y, además, puede ser clasificado mediante fagotipado y serotipado (Blumberg y col., 1992). El comité Internacional responsable de las recomendaciones sobre la taxonomía ha indicado que los *Staphylococcus* se deben encuadrar en la familia *Staphylococcaceae*.

Los estafilococos son comensales de las superficies corporales de los animales de sangre caliente. Las enfermedades que causan incluyen infecciones agudas, por ejemplo, septicemia y toxemias agudas, por ejemplo la intoxicación alimentaria estafilocócica.

*S. aureus* produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresinas y exotoxinas) implicadas en la patogenia. Varían desde componentes de la pared celular, por ejemplo ácidos teicoicos, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen la estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas y lipasas, leucocidinas y hemolisinas y, por último, pero de ningún modo menos importantes, las enterotoxinas que causan la intoxicación alimentaria. El modo de acción de la toxina no ha sido esclarecido del todo pero se cree que tanto los vómitos como la respuesta diarreica son el resultado de la estimulación de neuroreceptores locales existentes en el tracto intestinal y de la transmisión de los estímulos al centro del vómito del cerebro a través del vago y de otras partes del sistema nervioso simpático.

La cantidad de toxina que causa enfermedad depende del peso y de la sensibilidad individual, pero generalmente se coincide en que 0,1 - 1 µg/kg causará enfermedad en una persona. En los animales, la exposición reiterada a un determinado tipo antigénico de toxina origina un aumento de la tolerancia. (Microorganismos de los Alimentos, ICMSF, 1996)

- *Bacterias del Ácido Láctico* (BAL): son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos y bastones, catalasa-negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como principal producto final de la fermentación de los azúcares; mediante dos vías la homofermentativa, Embden-Meyer-Glucólisis, tal como se muestra en la figura 4, donde solo producen ácido láctico y la vía heterofermentativa donde además de ácido láctico se producen otros compuestos entre ellos CO<sub>2</sub> por la vía del ácido-6-fosfogluconico, figura 5 (Lyhs, 2002; Larpent, 1995a). En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y

pirimídicas. Esta es una de la razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A nivel de laboratorio se deben emplear medios complejos. Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies.

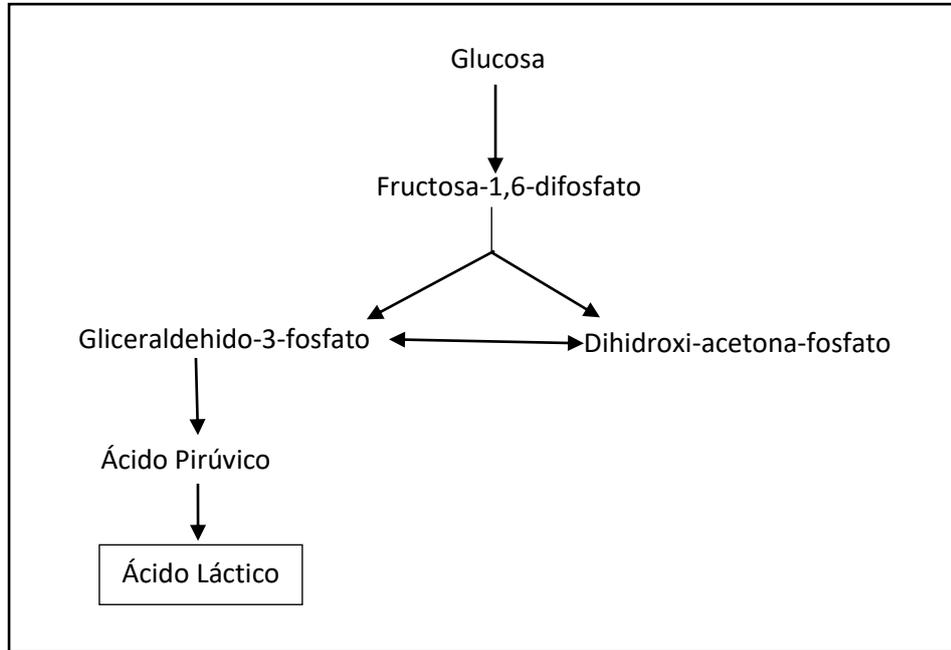


Figura 4: Fermentación láctica Homofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995a)

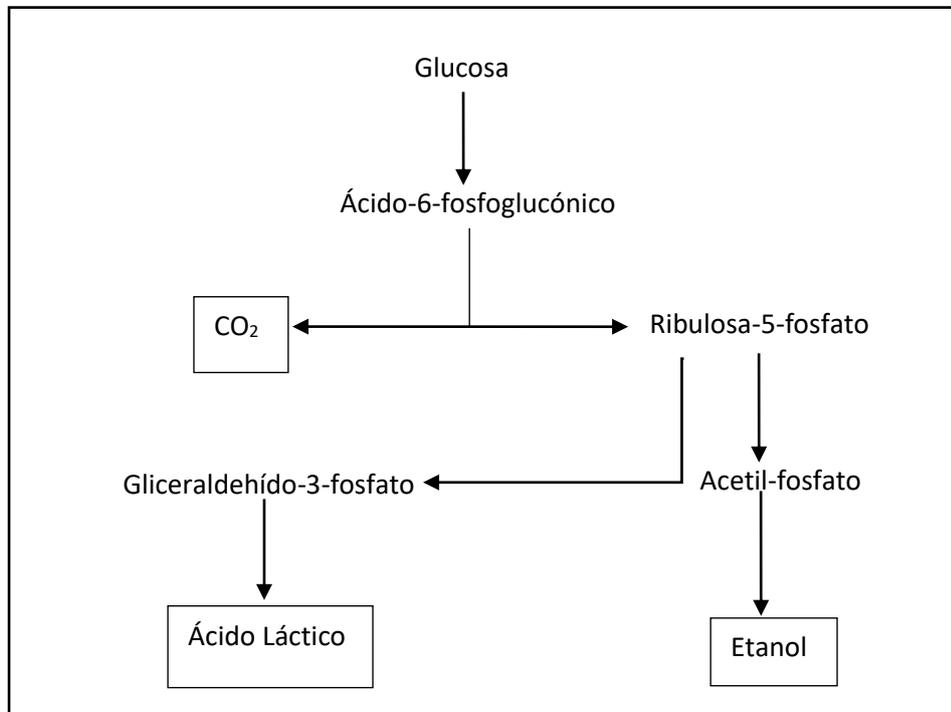


Figura 5: Fermentación láctica Heterofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995a)

La síntesis de dextranos y ácido láctico, la tolerancia de las bacterias ácido-lácticas a este ácido orgánico y a un pH inferior a 7 ha hecho que este grupo de microorganismos se emplee en la

industria de los alimentos para la conservación y mejora tecnológica de los productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados (Larpent, 1995a). Topisirovic y col (2006) estudiaron el efecto antimicrobiano de algunas bacteriocinas producidas por diversas cepas de BAL contra bacterias patógenas y no-patógenas obteniendo en general buenos resultados (ver Tabla 1) por lo que concluyen, entre otras cosas, que la presencia de este grupo de bacterias en los alimentos además de modificar sus propiedades físico-químicas, sensoriales y de textura, puede contribuir a un efecto protector de los mismos e incrementar su vida útil. (Cabeza Herrera, 2006)

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no-patógenas. (Topisirovic y col, 2006).

| CEPA DE BAL                                    | MICROORGANISMO ANTAGONISTA  |
|--|---|
| <i>Lactobacillus helveticus</i>                | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>St. pneumoniae</i> , <i>B. mycooides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> |
| <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>         | <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Salmonella paratyphi A</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>                    |
| <i>Lactobacillus paracasei subsp paracasei</i> | <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>               | <i>Clostridium sporogenes</i>   |

- *Bacillus subtilis*: bacteria Gram-positiva, aeróbica, que se encuentra comúnmente en el suelo. Pertenece a la división Bacteria, clase: Bacilli, género: *Bacillus*, especie *subtilis*.

Entre las características destacadas de este microorganismo está su capacidad para controlar ciertas enfermedades en cultivos vegetales. Se ha descubierto que produce ciertos compuestos de bajo peso molecular con mucha afinidad por el hierro, evitando la germinación de las esporas de hongos patógenos. Además, produce antibióticos muy efectivos contra los hongos y cuando se instala en las raíces y hojas, induce a la planta a producir fitoalexinas que confieren resistencia al ataque de hongos y nematodos patógenos. Esta es una característica que tiene muchas ventajas en comparación con los fungicidas químicos ya que no es tóxico para humanos, animales y plantas y no constituye un contaminante ambiental. Otra particularidad es la producción de ciertas enzimas que pueden ser usadas como aditivos en detergentes mejorando sus capacidades de limpieza.

### 1.2.2. Cultivo microbiano

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. El cultivo puede hacerse en forma discontinua o "en batch" (el cultivo se realiza en un volumen fijo de medio de cultivo) o continua ( el cultivo se lleva a cabo en un quimióstato cuyo volumen no cambia a pesar que se añade continuamente medio fresco a una velocidad constante y del que rebosa continuamente medio usado a la misma velocidad).

#### 1.2.2.1. Medios de cultivo

Un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO<sub>2</sub> atmosférico y heterótrofos si utilizan carbono orgánico.

La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente,  $C_4H_7O_2N$  lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50 % del peso seco, oxígeno (32 %), nitrógeno (14 %), fósforo (3 %), azufre (en torno al 1 %) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

Un medio de cultivo es una solución acuosa que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Los medios de cultivo pueden clasificarse en medios químicamente definidos (aquellos que se conoce exactamente su composición química) y complejos (utilizan hidrolizados de productos animales o vegetales, tales como caseína, carne, soja, extracto de levadura, de los cuales no se conoce su composición química exactamente).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos (cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros), diferenciales (cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos), selectivo-diferenciales (cuando combinan las dos características anteriores) y medios de enriquecimiento (permiten favorecer el crecimiento de un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño).

#### 1.2.2.1.1. Elaboración de medios de cultivo

Requiere proporcionar los elementos antes citados en una forma asimilable. Así, por ejemplo, el C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como  $CO_2$  para los autótrofos, el N en forma de  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  o  $NO_2^-$  o en forma de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; el P debe estar en forma de  $PO_4^{3-}$ , el S procede de aminoácidos sulfurados o de  $SO_4^{2-}$ , etc.

Además, en ciertos casos, es necesario añadir a los medios de cultivo algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar. Por lo cual el conocimiento de los requerimientos nutricionales de cada microorganismo es necesario para la formulación de los medios de cultivo.

#### 1.2.2.2. Crecimiento bacteriano en medio líquido

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente, formándose una suspensión de células libres.

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases, como muestra la figura 6, según la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

- Fase lag o de adaptación: los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o logarítmica: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.
- Fase estacionaria: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial.

Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

- Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

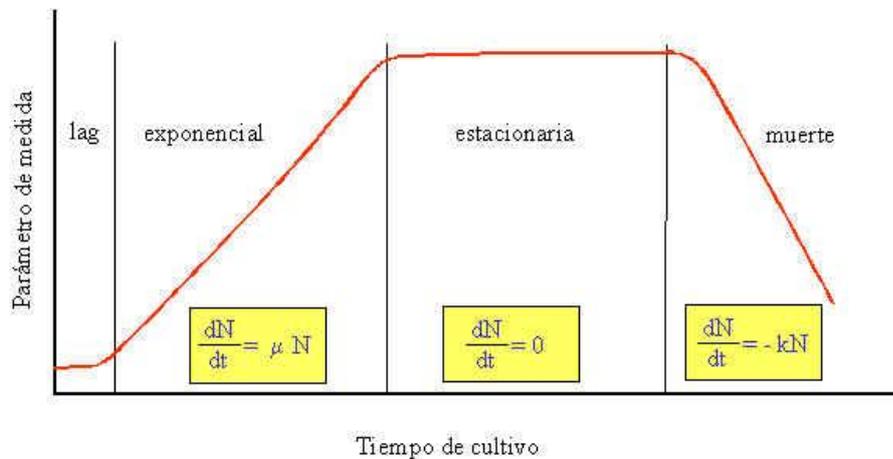


Figura 6: Cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido

#### 1.2.2.3. Crecimiento microbiano en medio sólido

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los cultivos líquidos se presentan también en cultivos sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de substrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo. Si el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un césped cuando se realizan los cultivos en placas de Petri.

#### 1.2.2.4. Esterilización

Esterilización se define como la destrucción completa o eliminación total de los microorganismos patógenos y saprófitos que se encuentran en el interior o en la superficie de objetos y sustancias.

La eliminación de los microorganismos puede efectuarse mediante procesos físicos, mecánicos o químicos. Los métodos físicos y mecánicos se incluyen en el término esterilización y los métodos químicos en el concepto de desinfección.

El método escogido para esterilizar un producto depende fundamentalmente de su naturaleza y estabilidad frente al calor u otros agentes esterilizantes. Existen sustancias o materiales termolábiles, para los cuales se utilizan métodos de esterilización que no alteren su estabilidad, uniformidad o identidad de dichas sustancias o materiales.

- Métodos físicos: se basan en la aplicación de agentes físicos naturales.
  - Calor seco: a la llama (usado para flamear las ansas, bocas de tubos de ensayo, etc.)
  - Calor húmedo: por agua en ebullición, por vapor fluyente, por vapor de agua a presión (autoclave para esterilizar medios de cultivo, eppendorf, glicerol, etc.)
  - Radiaciones: radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes.

- Métodos químicos: se consigue detener el metabolismo bacteriano a través de sustancias químicas como por ejemplo alcoholes, cloro, yodo, yodoforos, fenol, iones de metales pesado, agentes alquilantes, detergentes, formaldehído, etc. Los métodos químicos conducen a la antisepsia (impedimento o retraso del desarrollo de microorganismos patógenos en relación con organismos vivos) y/o a la desinfección (destrucción de microorganismos patógenos y saprófitos sobre objetos o superficies inanimadas).
- Métodos mecánicos: las sustancias que no se pueden esterilizar por métodos físicos ni químicos, se pueden esterilizar por un método mecánico como la filtración, es aplicable a la esterilización de líquidos y gases. Se basa en procesos físico-químicos observados entre los cuerpos microbianos o elementos en suspensión y una sustancia semiporosa. Así se consigue separar y retener los microorganismos de los líquidos que los contienen. Los líquidos a filtrar deben atravesar por presión o vacío, pequeños canalículos a nivel de cuyas paredes los microorganismos son retenidos por adsorción. Un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  es capaz de retener bacterias y sus endosporas, no así a los virus.

### 1.3. COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS

Los microorganismos son los seres vivos más antiguos del planeta, se encuentran prácticamente en cada nicho sobre la tierra mostrando una gran diversidad morfológica, ecológica, fisiológica y molecular. Sin la actividad microbiológica, sería imposible la vida en la tierra, pues la diversidad de los microorganismos juega un papel clave en el mantenimiento de la biosfera y proporciona un vasto e inexplorado recurso para la humanidad. Su número total se desconoce y los estudios *in situ* son muy difíciles (Stackebrandt, 1994). El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente (Llop, et al.; 1998). Ellos son la fuente del material básico para el desarrollo de medicamentos farmacéuticos, agentes agroquímicos y de biocontrol, cosméticos y productos industriales (ten Kate, 1995).

Los microorganismos que son aislados desde su ambiente natural son típicamente conservados en Colecciones de Cultivos Microbianos (CCM), siendo la base del conocimiento actual sobre la diversidad microbiana y el material de trabajo para estudios futuros. Son un inestimable recurso genético, que forman una pequeña parte dentro del inmenso número de microorganismos que no están descritos en la actualidad. Los objetivos del trabajo científico con microorganismos pueden ser variados y pueden incluir investigaciones medioambientales, taxonómicas, de la agricultura y biomédicas, así como la búsqueda de nuevos productos que puedan tener valor comercial. La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la Ciencia. La pérdida de tiempo y recursos asociada al reaislamiento subraya la necesidad de hacer depósitos de microorganismos en una Colección de Cultivos, que proporcione servicio de conservación experimentada, rápido acceso y la provisión de una cepa de referencia única y conservada. Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio.

Por otro lado para la mayoría de los ensayos microbiológicos es necesario contar con cultivos de referencia o controles que 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 CCM bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio (Sly, 1992).

El objetivo primario para la concepción de una Colección de Cultivos Microbianos es mantener las cepas en un estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos. Con el desarrollo de la biotecnología y la bioingeniería el mantenimiento de esta estabilidad y viabilidad adquiere mayor importancia (Smith y Onions, 1994).

Las Colecciones de Cultivos tienen la tarea de custodiar los recursos genéticos *ex situ*, constituyendo el mecanismo por el cual se asegura la diversidad microbiana, ya que juegan un papel clave en la conservación de recursos genéticamente estables (Kirsop and Hawksworth, 1994; Smith, 2000). De esta manera se puede disponer de recursos microbianos mantenidos y preservados según los intereses de la comunidad científica. Además de sus funciones básicas de conservación *ex situ* de organismos, tienen otras actividades/ funciones/ responsabilidades como custodiar recursos nacionales, suministrar recursos viables para el desarrollo de la ciencia, prestar servicios de identificación, de referencia taxonómica, de información y consultas profesionales, de entrenamientos e instrucción y apoyo especializado en innumerables áreas, realizar programas de investigación y establecer bases de datos y redes de información (Kirsop, 1991).

### 1.3.1. Historia y Actualidad

El surgimiento de los medios de cultivos sólidos para el crecimiento de los microorganismos y el éxito de los primeros aislamientos de cultivos puros, marcaron la necesidad de preservarlos para el futuro. La primera CCM se estableció en 1880 en Praga, Viena, por Frántisek Král, quien tuvo una visión de la importancia que las mismas tendrían para el desarrollo de la Ciencia. Se conoce que en este período también se establecieron otras Colecciones en los principales institutos de París, Berlín, Londres y Japón, pero la información al respecto es escasa. En 1890 Král publicó el primer catálogo de cultivos microbianos y esta colección se mantuvo durante 21 años. Actualmente algunos de los materiales que formaron parte de ella se conservan en el museo de Historia Natural de Viena. Según Porter, 1976, la otra colección más antigua fue creada en 1906 por la Asociación Internacional de Botánicos, en Baarn, Holanda. En 1919, se estableció la colección del Commonwealth Mycological Institute del Reino Unido y en 1925 la de Estados Unidos (American Type Culture Collection (ATCC)). Estas Colecciones son internacionalmente reconocidas y mantienen un gran número de cepas microbianas, algunas de ellas patentadas para procesos biotecnológicos. Las CCM están representadas internacionalmente por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC). Su número se ha incrementado y actualmente existen 714 colecciones en 72 países registrados en el Centro de Datos Mundial de Microorganismos. Estas pueden ser gubernamental, semi-gubernamentales, sustentadas por universidades o industrias o privadas; a su vez pueden especializarse en las ramas agrícola, forestal, marina, médica, veterinaria, industrial entre otras (WDCM, 2015).

La distribución de las Colecciones de Cultivos en diferentes países y regiones se muestra en el gráfico 1. Los tres colores muestran el número correspondiente de las colecciones de cultivos: 0 - 5; 5 - 10; por encima de 10. Mientras que en el gráfico 2 se muestra un mapa de distribución de los elementos conservados en diferentes países y regiones. Los tres colores muestran el número de cultivos conservados: 0 - 10.000; 10.000 - 100.000; por encima de 100.000.



Gráfico 1: Número de Colecciones de Cultivos registrados en diferentes países y regiones.

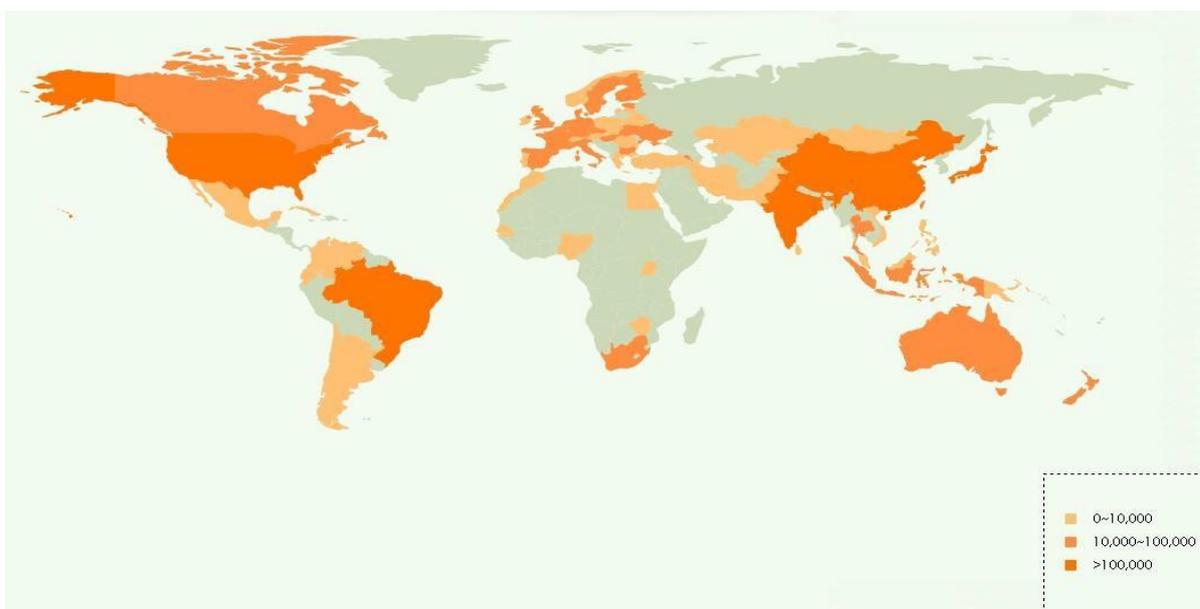


Gráfico 2: Distribución y cantidad de colecciones de cultivos en diferentes países y regiones de todo el mundo.

En las tablas siguientes se muestra el número de Colecciones de Cultivos y los Cultivos conservados en cada país o región, según el continente.

Tabla 2. Continente: ÁFRICA

| Países y Regiones | Colecciones de Cultivos | Cultivos     |
|-------------------|-------------------------|--------------|
| Egipto            | 1                       | 1808         |
| Marruecos         | 1                       | 1040         |
| Nigeria           | 2                       | 223          |
| Senegal           | 1                       | 210          |
| Sudáfrica         | 3                       | 10860        |
| Uganda            | 1                       | 550          |
| Zimbabue          | 2                       | 702          |
| <b>Total</b>      | <b>11</b>               | <b>15393</b> |

Tabla 3. Continente: AMÉRICA

| Países y Regiones | Colecciones de Cultivos | Cultivos       |
|-------------------|-------------------------|----------------|
| Argentina         | 12                      | 7094           |
| Brasil            | 65                      | 176.902        |
| Canadá            | 18                      | 82315          |
| Chile             | 1                       | *              |
| Colombia          | 2                       | 4474           |
| Cuba              | 9                       | 6336           |
| Ecuador           | 1                       | 2700           |
| México            | 18                      | 9078           |
| Estados Unidos    | 24                      | 242.436        |
| Venezuela         | 3                       | 2984           |
| <b>Total</b>      | <b>153</b>              | <b>534.319</b> |

Tabla 4. Continente: ASIA

| Países y Regiones | Colecciones de Cultivos | Cultivos      |
|-------------------|-------------------------|---------------|
| China             | 27                      | 156.049       |
| Hong Kong         | 1                       | 60            |
| India             | 27                      | 152.849       |
| Indonesia         | 18                      | 11237         |
| Corrí             | 8                       | 8593          |
| Israel            | 4                       | 776           |
| Japón             | 25                      | 247.037       |
| Corea (Rep. de)   | 21                      | 145.009       |
| Malasia           | 7                       | 4452          |
| Mongolia          | 1                       | 1500          |
| Pakistán          | 7                       | 2898          |
| Filipinas         | 6                       | 3456          |
| Singapur          | 3                       | 6289          |
| Sri Lanka         | 4                       | 342           |
| Taiwán            | 2                       | 67227         |
| Tailandia         | 60                      | 97401         |
| Vietnam           | 2                       | 7629          |
| <b>Total</b>      | <b>223</b>              | <b>912804</b> |

\* Sin Registros

Tabla 5. Continente: EUROPA

| Países y Regiones      | Colecciones de Cultivos | Cultivos       |
|------------------------|-------------------------|----------------|
| Armenia                | 1                       | 11520          |
| Austria                | 2                       | 6070           |
| Bielorrusia            | 1                       | 1175           |
| Bélgica                | 7                       | 56128          |
| Bulgaria               | 4                       | 12979          |
| Checo                  | 13                      | 11,241         |
| Dinamarca              | 3                       | 88566          |
| Estonia                | 4                       | 13300          |
| Finlandia              | 2                       | 10412          |
| Francia                | 38                      | 86350          |
| Alemania               | 13                      | 93368          |
| Grecia (Helénica Rep.) | 6                       | 6377           |
| Hungría                | 8                       | 13962          |
| Irlanda                | 1                       | 380            |
| Italia                 | 10                      | 23879          |
| Kazajstán              | 2                       | 398            |
| Letonia                | 1                       | 1361           |
| Países Bajos           | 6                       | 90775          |
| Noruega                | 2                       | 3028           |
| Polonia                | 9                       | 8545           |
| Portugal               | 5                       | 7035           |
| Rumania                | 2                       | 760            |
| Federación Rusa        | 22                      | 60168          |
| Eslovaco               | 3                       | 4916           |
| Eslovenia              | 3                       | 12242          |
| España                 | 4                       | 10321          |
| Suecia                 | 3                       | 52700          |
| Suiza                  | 4                       | 3965           |
| Pavo                   | 10                      | 5607           |
| Reino Unido            | 19                      | 84210          |
| Ucrania                | 7                       | 10944          |
| Uzbekistán             | 3                       | 1,443          |
| Yugoslavia             | 2                       | 897            |
| <b>Total</b>           | <b>220</b>              | <b>795.022</b> |

Tabla 6. Continente: OCEANÍA

| Países y Regiones  | Colecciones de Cultivos | Cultivos       |
|--------------------|-------------------------|----------------|
| Australia          | 34                      | 82946          |
| Nueva Zelanda      | 6                       | 25045          |
| Papúa Nueva Guinea | 1                       | 270            |
| <b>Total</b>       | <b>41</b>               | <b>108.261</b> |

Fuente: Culture Collections Information Worldwide (WDCM, 2015)

### 1.3.2. Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos

En la última década se ha visto un incremento en la valoración de las Colecciones de Cultivos de Microorganismos tanto para la conservación de recursos genéticos y la biodiversidad, como para proveer la fuente esencial para el desarrollo biotecnológico mundial. Por estas razones muchos

países han apoyado el establecimiento de Colecciones de Cultivos que brinden servicios en su país o en la región y que desarrollen sus propios programas de investigación. A pesar de existir diversas publicaciones que proponen técnicas y procedimientos, algunos países han publicado guías nacionales y regionales; internacionalmente no existía ningún documento que brinde los aspectos mínimos que reglamenten el trabajo de las Colecciones de Cultivos hasta el año 1990, cuando la WFCC desarrolló los Lineamientos para el Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos, cuyos principios pueden ser aplicados a cualquier Colección de Cultivos independientemente de su tamaño y su poder adquisitivo. Este documento describe los propósitos de las mismas; los servicios que éstas pueden brindar a la comunidad científica en cuanto a recursos, información y personal especializado; la necesidad de contar con instalaciones apropiadas, la cantidad de personal adecuado y de alto nivel profesional, que garanticen el apoyo necesario a largo plazo para brindar estos servicios; las contribuciones hechas por las Colecciones a la investigaciones básicas sobre estudios taxonómicos, procedimientos de preservación, cultivo y manipulación de microorganismos; la capacidad de las Colecciones de conocer todas las regulaciones de control, transportación y seguridad durante la distribución y manipulación de los recursos genéticos; la necesidad de brindar apoyo y entrenamiento a otras Colecciones y la necesidad de la colaboración internacional para incrementar el valor y calidad de los recursos biológicos (WFCC, 1999). Por la importancia que representa este documento para el establecimiento y operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos, a continuación se presenta un resumen de los principales aspectos que se deben tener en cuenta para el cumplimiento de esta guía internacional.

#### 1.3.2.1. Organización

La organización responsable de la CCM debe aceptar y estar completamente consciente de las responsabilidades inherentes al mantenimiento de la misma. El compromiso de mantenerla y prestar servicios (según proceda) a largo plazo debe estar incluido en los planes estratégicos o en los objetivos de la organización (WFCC, 1999).

#### 1.3.2.2. Recursos biológicos

La extensión del material y número de cepas que se tendrán requiere una cuidadosa estimación y conciliación con la organización de la cual forma parte la Colección. Se debe adoptar una política que balancee la capacidad de la Colección con respecto a las necesidades de la ciencia (WFCC, 2014). Las cepas mantenidas que son potencialmente patógenas al hombre, animales o plantas, o producen compuestos tóxicos o alucinógenos, deben estar claramente identificadas y mantenidas en condiciones de seguridad. Las Colecciones pueden variar sustancialmente la extensión de los grupos de microorganismos mantenidos por varias razones, entre ellas, por orientación de sus clientes; por tanto esto debe considerarse en las etapas iniciales de planificación de los recursos (WFCC, 2014).

#### 1.3.2.3. Personal

Las Colecciones de Cultivos tienen una labor intensiva y esto incluye la preservación, mantenimiento, documentación y los chequeos de viabilidad de rutina. Es necesario contar con personal suficiente y capacitado no solo para la incorporación de nuevos cultivos y su mantenimiento, sino también para cumplir el nivel de suministros de los mismos y otros servicios que brinda la Colección. Se requiere conocimientos sobre microorganismos, su crecimiento y requisitos de preservación, técnicas para su identificación, taxonomía, autenticación y aplicaciones potenciales. El personal clave debe tener experiencia directa o entrenamiento especializado en el manejo de una Colección de Cultivos. Cuando se requiera apoyo adicional con especialistas en taxonomía se deben establecer vínculos de colaboración (WFCC, 1999).

#### 1.3.2.4. Documentación

Es necesario elaborar y mantener en forma adecuada y segura registros de cada cepa conservada. Los mismos deben ser computarizados pero para mayor seguridad debe mantenerse una copia impresa actualizada y disponible. El personal de la Colección debe estar familiarizado con la operación del sistema computarizado, para garantizar la continuidad del servicio (WFCC, 1999).

#### 1.3.2.5. Normas de seguridad y calidad

Los aspectos de seguridad de todas las operaciones llevadas a cabo en la Colección necesitan ser cuidadosamente controlados, teniendo en cuenta las regulaciones nacionales de seguridad y salud, así como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Se entiende por Bioseguridad al conjunto de métodos tendientes a minimizar el riesgo asociado al manejo de los microorganismos, mediante la protección de operadores, personas del entorno, animales y el medio ambiente. Involucra técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y diseño de las instalaciones. Las BPL son un conjunto de reglas, procedimientos operativos y prácticos establecidos por una determinada organización para asegurar la calidad y la rectitud de los resultados generados por un laboratorio (AOAC, 2002).

#### 1.3.2.6. Aseguramiento de la calidad

Los procedimientos seguidos por las Colecciones de recursos microbianos deben garantizar la calidad del producto brindando cultivos que permitan obtener resultados reproducibles. Existen un gran número de modelos nacionales e internacionales para los Sistemas de Aseguramiento de Calidad que pueden ser utilizadas por las colecciones de cultivos, entre ellas están las ISO 9001 y las normas para la acreditación, tal como ISO/IEC 17025.

Los métodos necesitan ser validados para garantizar su capacidad de proveer resultados similares a los obtenidos por los métodos tradicionales y, por tanto, comenzaron a elaborarse guías por diferentes organizaciones expertas alrededor de todo el mundo para las validaciones de estos métodos, en las cuales se abordan, desde los conceptos aplicados en los documentos, hasta el procesamiento estadístico de los datos obtenidos y su análisis con las conclusiones del estudio.

El término validación se utiliza para indicar el proceso que provee evidencia objetiva que el método es capaz de servir a su uso esperado, es decir; para cuantificar o detectar microorganismos específicos, para lo cual deben determinarse sus características de desempeño a fin de comprobar que cumple con los requisitos especificados para ese uso particular. El término verificación se utiliza, para indicar el proceso que lleva a cabo el laboratorio con el fin de demostrar su capacidad para ejecutar correctamente un método normalizado cuando lo realiza exactamente como está descrito en la norma (OAA , 2011).

La validación de los métodos es el proceso donde se evalúa si un método analítico es aceptable para un propósito definido. Según el Sistema nórdico de validación de métodos microbiológicos alternativos (NordVal), la validación de un método alternativo es el procedimiento para demostrar si los resultados obtenidos por dicho método son comparables con aquellos obtenidos utilizando los métodos de referencia.

Los principales órganos reguladores a escala mundial, dedicados a estos temas, entre los que se encuentran: ISO, AOAC, NordVal, Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), Comité de Normalización Europea (CEN), proponen esquemas para la validación de estos métodos alternativos, donde recomiendan diferentes parámetros a determinar, coincidiendo entre sí en muchos de estos, pero con algunas diferencias. Los procedimientos descritos en ISO 16140 (protocolo para la validación de métodos alternativos), AFNOR y NordVal, requieren que el laboratorio experto esté acreditado para realizar estudios en el campo de la aplicación para la cual se hace el estudio, sin embargo, esto no constituye una exigencia para AOAC (Ortega González y col., 2010).

### 1.3.2.7. Preservación

Los microorganismos a menudo requieren de métodos de preservación especiales para asegurar su óptima viabilidad, almacenamiento, pureza y estabilidad. Para mayor seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de cepas, cada una de estas debe ser mantenida al menos por dos procedimientos diferentes, siempre que sea factible. Como mínimo uno de ellos debe ser la liofilización o la criopreservación, ya que estos son los mejores métodos para la minimización de los riesgos de cambios genéticos para la mayoría de las cepas. En algunos casos, donde solo es aplicable la congelación, debe conservarse el material duplicado en refrigeradores separados con diferente alimentación eléctrica o en contenedores de nitrógeno líquido separados (WFCC, 1999). Para muchos grupos de microorganismos existe adecuada experiencia sobre los métodos óptimos de preservación, sin embargo esto no es así para todos los microorganismos y generalmente en estos casos es necesario desarrollar investigaciones para determinar el protocolo de preservación óptima.

Los procedimientos seguidos por una colección de cultivos deben garantizar la calidad del producto de manera que los resultados puedan ser reproducibles, por lo que se deben aplicar medidas de aseguramiento y control de la calidad. Smith en 1996, establece los aspectos esenciales que debe abarcar una norma para las colecciones de cultivos microbianos tales como identificación adecuada de las cepas, pureza, viabilidad, autenticidad, uso de metodologías documentadas, cumplimiento de las legislaciones, entre otros. Puede definirse:

- **Pureza:** Se considera un cultivo puro aquel formado por un solo tipo de microorganismo. Este chequeo debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento (Smith, 1996). Puede realizarse en la misma placa de Petri en la cual se hace el chequeo de viabilidad. Estas placas son examinadas para detectar ausencia de contaminantes. Es necesario tener en cuenta que existen microorganismos de crecimiento lento que pueden estar contaminando nuestros cultivos, por lo que estas placas se deben mantener por un período de tiempo mayor y posteriormente se reexaminan (Hill, LR y Kirsop, BE; 1991). En ocasiones es necesario hacer chequeos de pureza utilizando varios medios de cultivo para descartar la presencia de microorganismos que requieren otras condiciones nutricionales para su crecimiento.
- **Viabilidad:** Se define como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en determinadas condiciones. El chequeo de viabilidad se realiza con el objetivo de detectar el nivel de supervivencia del cultivo. Esto permite que en la medida que ésta disminuya se puedan tomar medidas para impedir la pérdida del material. Este monitoreo al igual que el de identidad y pureza, debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento (Smith, 1996). Puede realizarse por diferentes métodos; en el caso de la preservación por el método de subcultivo, es suficiente realizar un pase de cultivo a un medio fresco, este se incuba y posterior al tiempo de incubación se puede determinar si el cultivo está viable por la observación de colonias típicas del microorganismo; pero este método es cualitativo. En el caso de métodos de conservación a largo plazo como la liofilización y congelación, este control se realiza cuantitativamente por el método de conteo en placas utilizando diluciones seriadas (Simione y Brown, 1991). Se considera como un nivel de viabilidad adecuado la recuperación del 50 - 75 % de las células preservadas, aunque tales niveles no pueden obtenerse para todos los tipos microbianos, por lo que esto debe quedar definido en los procedimientos documentados de la Colección (Smith, 1996).
- **Autenticidad mediante estabilidad de las propiedades de la cepa:** hace referencia a la capacidad de permanecer genéticamente estable. 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 (Smith, 1996). Los estudios de estabilidad pueden incluir el chequeo en el tiempo de la viabilidad, la pureza y la identidad de las cepas.

### 1.3.3. Técnicas de preservación

El método de conservación de microorganismos debe garantizar la supervivencia de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de eventos genéticos y de contaminación. La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación o por combinación de ambos (Sly, 1992).

Son utilizadas varias técnicas para conservar bacterias pero no todas las especies responden de manera similar, en adición cada método de preservación tiene ventajas y desventajas; por lo tanto es necesario hacer una selección del método a utilizar teniendo en cuenta las características de cada técnica, factibilidad de su uso, recursos disponibles y necesidades del usuario (Snell, 1991; Smith, 1996). Generalmente la elección depende de la disponibilidad del equipamiento y de la competencia del personal, asimismo es recomendable utilizar más de un método de preservación y trabajar con réplicas del microorganismo que se desea preservar como medida de seguridad (Sly, 1992). Algunos de los métodos utilizados para la conservación bacteriana son:

- **Liofilización:** Consiste en la eliminación del agua de una suspensión congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada, el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada. El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características fisicoquímicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, el equipo liofilizador, la concentración de los microorganismos, entre otros. Un modelo de Liofilizador se muestra en la figura 7. El medio de preservación es esencial para proteger las células de los daños producto de los procesos de congelación y sobresecado. La elección del medio depende del microorganismo de manera que se logre mantener la viabilidad y permita un buen recobrado posterior al proceso de liofilización. Usualmente el medio de preservación contiene altos niveles de suero, proteínas, aminoácidos (ej.: glutamato monosódico), carbohidratos (ej.: glucosa, sacarosa) o leche descremada (Sly, 1992). Este método es uno de los más eficaces para la conservación de muchos tipos de microorganismos, como: bacterias, hongos, bacteriófagos y virus; algunos de ellos pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años (ATCC, 1991; Sly, 1992). Es conveniente para la conservación por largos períodos de tiempo, no se requiere de una atención constante después de almacenarse los cultivos liofilizados y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio (Snell, 1991). Las desventajas son el costo del liofilizador, su mantenimiento; el ser un proceso que lleva tiempo, requiere personal entrenado y el vial conservado es de un solo uso.



Figura 7: Modelo de Liofilizador

- Congelación: Conocida también como criopreservación, consiste en la congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas. En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser - 20 °C, - 70 °C y temperaturas de nitrógeno (fase de vapor: - 140 °C; fase líquida: - 196 °C). La temperatura de almacenamiento seleccionada depende de los recursos disponibles, pero las temperaturas más bajas favorecen la viabilidad y la estabilidad genética (Sly, 1992). La mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos, virus, bacteriófagos) sobreviven largos períodos el almacenamiento en estado de congelación por la reducción marcada de su ritmo metabólico. Algunos protozoos, algas y células humanas también pueden ser preservados por este método (Sly, 1992). Existen muchos factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, por lo que deben realizarse pruebas de ajustes del grado de enfriamiento y calentamiento, además de la adición de crioprotectores a la suspensión celular (Snell, 1991). Los aditivos crioprotectores son compuestos químicos de gran afinidad por el agua y son utilizados para disminuir los daños durante el proceso de congelación, ejemplo de ellos son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) (ATCC, 1991). El almacenamiento de microorganismos por el método de congelación a temperaturas extremadamente bajas es muy simple y se ha logrado estandarizar para la preservación de un amplio rango de microorganismos. Con él se obtiene la más reducida pérdida de viabilidad, un alto grado de estabilidad y períodos de sobrevivencia de más de 30 años. Si bien este método da muy buenos resultados en cuanto a la conservación, cuenta con la desventaja que una vez descongelado el vial no debe volver a congelarse.

Existe un método comercial, en el que los microorganismos son conservados en viales que cuentan con “perlititas” en su interior donde los mismos son adheridos y congelados. Al momento de activar una cepa se extrae una perla del vial y se siembra en un medio líquido o sólido, tal como el método de conservación de bacterias CRYOBANK aceptado y reconocido internacionalmente, figura 8 y 9 (Copan, 1996). Este método es ampliamente utilizado ya que presenta la ventaja que al momento de necesitar cultivar un microorganismo se puede tomar rápidamente una perlitita individual sin descongelar todo el vial. La desventaja del mismo es su elevado costo y la imposibilidad de comprar los viales en forma individual.

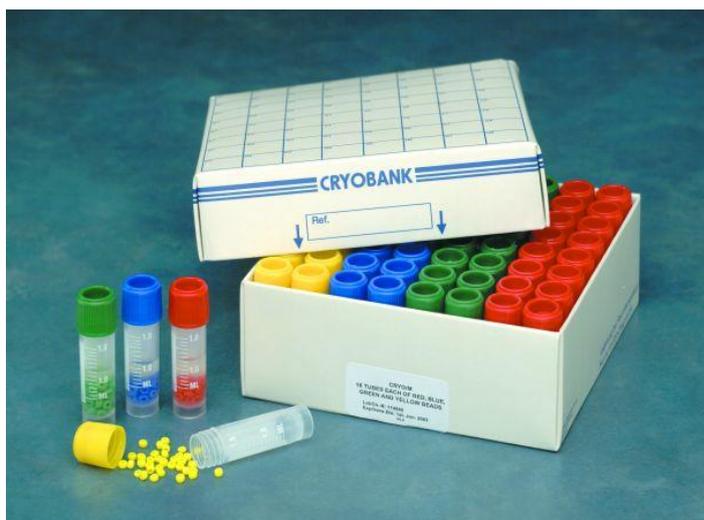


Figura 8: Caja de 64 viales



Figura 9: Viales

## 1.4. PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1.4.1. Fundamentación del problema

La Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, forma parte de una de las 12 Colecciones de Cultivo de nuestro país. La misma conserva un gran número de bacterias lácticas, aisladas de fermentaciones de aceitunas verdes llevadas a cabo en establecimientos productores del Gran Mendoza, representan una riqueza en cuanto al material genético autóctono y adaptado a la región, y son objeto de estudios permanentes por su potencial aplicación industrial. Además la Colección posee un gran número de bacterias utilizadas en las actividades de docencia, investigación y extensión. Cuenta con 624 bacterias lácticas y 25 bacterias utilizadas en docencia, entre ellas algunas patógenas causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Este número va incrementándose como fruto de nuevas investigaciones y servicios realizados en la actualidad.

Los registros con los datos de cada una (fecha de aislamiento, localización geográfica, procedimiento y temperatura de preservación, lugar de almacenaje) se encuentran en formato digital e impresos. Los individuos están registrados bajo un código de identificación único precedido por el acrónimo FCA.

La utilización de la liofilización como método de elección para la conservación de las mismas solo es viable para algunas cepas, que por su importancia biotecnológica, justifican el gran esfuerzo de su acondicionamiento.

En la práctica es frecuente el uso de viales tipo eppendorf con solución crioprotectora conservados por congelación, pero esto tiene una aplicación muy limitada debido a que una vez descongelado no es conveniente volver a congelarlo, ya que durante el proceso de congelación/descongelación las bacterias pueden sufrir mutaciones, por lo que el método no garantiza la estabilidad bacteriana.

Pueden utilizarse mostacillas en una forma de simular el método CRYOBANK pero para ello es necesario evaluar si la performans o efectividad del método alternativo es comparable con el método de referencia CRYOBANK; es decir, que presente resultados aceptables en cuanto a viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas bacterianas conservadas. De esta forma podría contarse con un método de conservación de bacterias alternativo, eficaz, pero a un costo accesible.

#### 1.4.2. Hipótesis General

- El número de microorganismos recuperados por el método de conservación alternativo es similar al del método de referencia.

#### 1.4.3. Objetivo general

- Evaluar la efectividad de un método de conservación microbiana alternativo respecto al método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado CRYOBANK.

#### 1.4.4. Objetivos específicos

- Establecer el método de conservación alternativo.
- Conservar las cepas por el método alternativo y por el método CRYOBANK
- Evaluar viabilidad previamente y a diferentes tiempos de conservación por ambos métodos.
- Determinar pureza y estabilidad de los cultivos microbianos antes y después de su conservación por ambos métodos.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias Enológicas y Agroindustriales, U.N.Cuyo.

### 2.1. MATERIALES

Se utilizaron los siguientes materiales, que se muestran en la figura 10:

- Mechero
- Ansa de vidrio o espátula de Drigalsk, ansa recta y en arito
- Tubos de ensayo y gradillas
- Micropipetas de 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l, con los correspondientes tips y recipiente para descartarlos
- Vortex
- Eppendorfs estériles
- Cajas de Petri
- Vaso de precipitado
- Porta objetos y cubre objetos
- Pinza de madera
- Algodón
- Medios de cultivos adecuados según género y requerimiento.
- Colorantes para Gram: Solución de cristal violeta, Solución de Lugol, Alcohol etílico, Solución de safranina, aceite de inmersión

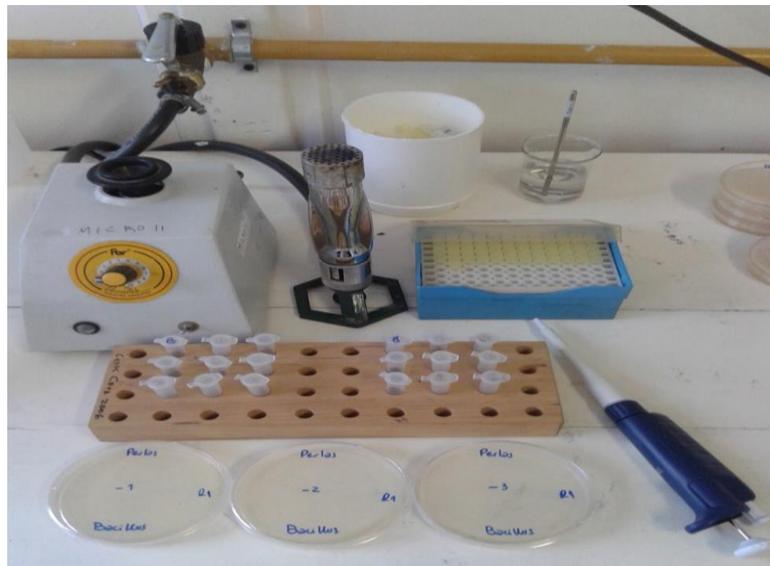


Figura 10: Materiales usados para la conservación de cepas bacterianas

### 2.2. CEPAS BACTERIANAS

Se conservaron doce cultivos microbianos, que incluyeron tres cepas de *Escherichia coli*, entre ellas el serotipo O157:H7, dos cepas de *Salmonella*, una cepa de *Staphylococcus aureus*, una cepa de *Bacillus subtilis*, una cepa de *Listeria monocytogenes*, una cepa de *Enterobacter sp.* y tres cepas de bacterias lácticas, pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la F.C.A.

## 2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados, cuyas composiciones se detallan en el anexo, fueron:

2.3.1. Agar para Recuento en Placa (PCA) (Marca: Britania. Origen: Argentina): es un medio de cultivo exento de sustancias inhibitoras e indicadores y concebido esencialmente para la determinación del número total de microorganismos en leche, productos lácteos, aguas y otros materiales, por lo cual fue utilizado para el recuento microbiano.

2.3.2. Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Marca: Britania. Origen: Argentina): contienen polisorbato, acetato de magnesio y manganeso, sustancias conocidas como factores especiales, así como una base nutritiva abundante y rica para el crecimiento de bacterias lácticas, que son microorganismos poliauxótrofos.

2.3.3. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (Marca: Oxoid. Origen: Inglaterra): este medio es utilizado para caracterizar cepas del género *Salmonella*. En su composición lleva xilosa, lactosa y sacarosa lo que permite determinar su conversión a productos ácidos mediante el viraje del indicador rojo fenol a amarillo. Debido a que esta bacteria no degrada estos azúcares sus colonias permanecen del mismo color del medio de cultivo. El tiosulfato y la sal de hierro (III) revelan la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfuro de hierro negro en las colonias. Las bacterias que decarboxilan la lisina, produciendo cadaverina, se reconocen por la presencia de un color rojo-púrpura, debido al aumento del pH, alrededor de sus colonias. El efecto inhibitor del medio es débil.

2.3.4. Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa- Sacarosa (Agar EMB) (Marca: Britania. Origen: Argentina): permite el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. Este medio se usó para las cepas *Escherichia coli* y *Enterobacter sp.*

2.3.5. Medio Mossel (Marca: Merck. Origen: Alemania): El medio contiene los nutrientes necesarios para el apropiado desarrollo bacteriano y debido a la presencia de manitol y del indicador de pH rojo de fenol, permite diferenciar bacterias fermentadoras del mismo, que acidifican el medio produciendo el viraje del rojo al amarillo, de bacterias que no lo fermentan, cuyas colonias no producen cambio de color. La adición de emulsión de yema de huevo, mejora el aislamiento y la esporulación de esta bacteria, además favorece y facilita la visualización de las colonias de *B. cereus* ya que son grandes, rosas e irregulares y se produce un halo de precipitación de la lecitina hidrolizada alrededor de las mismas; mientras que *Bacillus subtilis* presenta colonias amarillas, sin halo de precipitación.

2.3.6. Agar Baird Parker (Marca: Britania. Origen: Argentina): Este medio de cultivo contiene cloruro de Litio y telurito para la inhibición de la microbiota acompañante, en tanto que el piruvato y la glicina actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de estafilococos. Sobre el medio de cultivo, opaco por su contenido en yema de huevo, las colonias de *Staphylococcus* muestran dos características diagnósticas lipólisis y proteólisis, por lo que se producen halos y anillos característicos alrededor de las colonias y debido a la reducción del telurito a teluro, se desarrolla una coloración negra.

2.3.7. Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC) (Marca: Britania. Origen: Argentina): Este medio de cultivo se utiliza para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7, a partir de alimentos y heces. Se emplea la característica de dicho organismo de no fermentar este azúcar, a diferencia de la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* que sí lo hacen. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben la microbiota Gram-positiva. El sorbitol junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para comprobar la degradación de dicho azúcar.

2.3.8. Agar Palcam base (Marca: Oxoid. Origen: Inglaterra): Es un medio de cultivo que, con el agregado de antimicrobianos, permite el aislamiento selectivo de *Listeria monocytogenes*. Es diferencial debido a que el producto de hidrólisis de la esculina en presencia de iones  $Fe^{+3}$  forma un compuesto fenólico de color negro. Con el agregado del Suplemento Selectivo para el Agar Palcam se logra un crecimiento apropiado y una clara visualización de las colonias de *Listeria* sp., mientras que se inhibe total o parcialmente el desarrollo de la microbiota acompañante presente en la muestra en estudio.

## 2.4. ACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Cada uno de los cultivos bacterianos conservados a - 20 °C se sembraron en medios de cultivo sólido, MRS o Agar para Recuento en Placa, por estrías en paralelo. Las cajas se incubaron a 28 °C en el caso de bacterias lácticas y alterantes y a 37 °C en el caso de bacterias patógenas para el hombre.

## 2.5. CONTROL DE PUREZA

Para la determinación de pureza del cultivo microbiano se realizaron:

2.5.1. Determinación de las características culturales: se realizó una observación y descripción de las colonias en los medios de cultivos sólidos Agar para Recuento en Placa y medios selectivos y diferenciales específicos para cada cepa. Se observaron las características culturales, forma y tamaño de la colonia, cambios en el color del medio, etc., con el objeto de corroborar las propiedades bioquímicas típicas de cada microorganismo y a la vez verificar pureza mediante la observación de homogeneidad de las colonias.

2.5.2. Determinación de las características morfológicas: a partir del cultivo activo se realizaron las siguientes observaciones con el objeto de evaluar que la morfología celular se corresponda con las cepas originalmente almacenadas.

- Observación directa o en fresco entre porta y cubre: se agregaron 2 a 3 gotas de suspensión bacteriana a portas limpios y desengrasados, se les colocó un cubre objeto y se observó al microscopio óptico con el aumento 40 X. Esta técnica permite también determinar movilidad bacteriana.
- Observación directa o en fresco con Tinción Negativa (tinta china o nigrosina): se agregaron 2 a 3 gotas de suspensión bacteriana a portas limpios y desengrasados, se les adicionó una gota de nigrosina, se dejó secar al aire y se observó al microscopio óptico con el aumento 100 X.

2.5.3. Tinción de Gram: se realizó la coloración de Gram con el objetivo de verificar que la tinción correspondía a la descripción de la cepa almacenada. Para ello se le agregaron 2 a 3 gotas de suspensión bacteriana a portas limpios y desengrasados, se les adicionaron los colorantes correspondientes, se dejó secar al aire y se observó al microscopio óptico con el aumento 100 X.

## 2.6. PROTOCOLO DE CONSERVACIÓN DE CEPAS

Se siguieron dos protocolos de conservación, el descrito en las instrucciones de uso del Método CRYOBANK y el propuesto con mostacillas como Método Alternativo:

### 2.6.1. Conservación de bacterias por el Método CRYOBANK (MCbank)

- a) A partir de la caja de cultivo que contenga el cultivo puro y fresco (no más de 18 horas), se retiró una muestra concentrada y se inoculó en el medio de CRYOBANK. (ver Anexo)
- b) Se agitaron los viales hasta incorporar completamente la muestra al medio, para permitir que las bacterias se adhieran a las perlas.
- c) Luego de 30 minutos se removió el medio de cultivo con una micropipeta y se llevó a congelación.

Nota: si bien el método CRYOBANK recomienda almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido, debido a la carencia de dicho equipamiento, la conservación por ambos métodos se realizó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.6.2. Conservación de bacterias por el Método Alternativo (MA)

- a) A partir del cultivo puro se tomaron colonias con un ansa estéril y se suspendieron en un tubo de ensayo que contenía 2 mL de agua peptonada al 1 % hasta llegar a una turbidez semejante al tubo de nivel 1 de la Escala de McFarland, correspondiente a una densidad bacteriana de  $3 \times 10^8$  células. (Ver Anexo)
- b) Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior en eppendorfs con 25 mostacillas + 1 mL de solución crioprotectora (leche: glicerol en relación 9:1) estériles y se mezclaron en vortex.
- c) Se dejaron reposar 30 minutos, se retiró la solución crioprotectora y se almacenaron los eppendorf con las mostacillas impregnadas en bacterias a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cada cepa se almacenó por triplicado, como se observa en la figura 11.

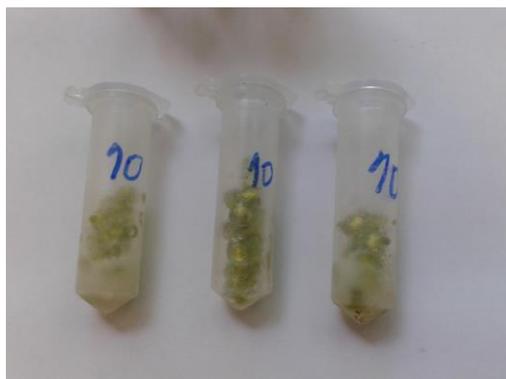


Figura 11: Eppendorf con mostacillas estériles

## 2.7. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN

Se evaluó la efectividad de un Método Alternativo para la conservación bacteriana, el MA, al momento inicial, 24 hs, 1, 3, 6 y 15 meses para determinar el comportamiento de los viales.

2.7.1. Recuento de microorganismos viables: en cada una de las cepas conservadas se determinó el número de bacterias previas a la conservación inicial, luego de 24 hs y transcurridos 1, 3, 6 y 15 meses de su conservación. Los recuentos se realizaron por triplicado.

- a) Se agregó con el ansa una mostacilla a un eppendorf estéril que contenía 450  $\mu$ L de agua peptonada al 1 % (dilución  $10^{-1}$ ) y se agitó en vortex.
- b) Se realizaron diluciones decimales seriadas acondicionando 50  $\mu$ L de la dilución anterior a eppendorf estériles con 450  $\mu$ L de agua peptonada al 1 % hasta dilución  $10^{-5}$ .
- c) La siembra fue realizada por la técnica de agotamiento en superficie, para lo cual 100  $\mu$ L de cada dilución se esparció en cajas de Petri con Agar para Recuento en Placa, con espátula de Drigrasky.
- d) Se incubaron por 24 - 48 hs a la temperatura correspondiente según la cepa.
- e) Se efectuó el recuento de UFC y se obtuvo el resultado teniendo en cuenta la dilución y el factor de siembra para expresar UFC/mL.

### 2.7.2. Control de pureza y estabilidad

Se realizaron las determinaciones según el punto 2.5.

### 2.7.3. Recuperación de las cepas conservadas

Se realizó el cociente entre las UFC/mL a los 6 y 15 meses sobre las UFC/mL al momento de su conservación, para determinar el porcentaje de recuperación de cada cepa, como se muestra en la siguiente fórmula según Párraga Estrada (2013).

|  |
|--|
| $\text{Recuperación (\%)} = (\text{LOG UFC/mL recuperado} / \text{LOG UFC/mL inoculado}) \times 100$ |
|--|

En el caso de métodos de conservación a largo plazo, como la liofilización y congelación, se considera que el nivel de recuperación debe estar entre el 50 - 75 % de las células preservadas (Smith, 1996).

## 2.8. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Con el objeto de asegurar la calidad e integridad de los resultados obtenidos durante todo el desarrollo del trabajo, se realizaron los siguientes controles:

2.8.1. Control de calidad de los medios de cultivo: se les realizó la prueba de esterilidad y el control de crecimiento de microorganismos a los medios de cultivo utilizados. Para ello cada medio de cultivo fue preparado según las indicaciones del envase (ver Anexo), esterilizados y plaqueados en cajas de Petri:

- Prueba de esterilidad: se escogió al azar una caja por cada lote y se llevó a incubar a temperatura adecuada durante 24 - 48 hs. La ausencia de crecimiento microbiano significó una correcta esterilización del medio y de la caja de Petri, por lo que el lote de cajas con medio era apto.
- Control de crecimiento de microorganismos: se escogió al azar una caja por cada lote y se sembró un control positivo correspondiente a cada medio.

2.8.2. Control de la calidad microbiológica del aire en el lugar de trabajo: se realizó el método de deposición gravitacional colocando cajas de Petri con Agar para Recuento en Placa abiertas durante 15 minutos, sobre la mesada a 15 cm del mechero, cada vez que se iniciaba un ciclo de trabajo.

2.8.3. Control de esterilización: se utilizaron cintas indicadoras para determinar la efectividad del proceso de esterilización del autoclave, utilizado para medios de cultivo, agua peptonada, tips, etc.

2.8.4. Control de estufas de cultivo: se realizó el seguimiento de la temperatura de incubación de las estufas, 28 °C y 37 °C. (Ver Planillas Anexo)

## **2.9. BIOSEGURIDAD**

Se adoptaron pautas de seguridad en el laboratorio correspondiente a un nivel II de Bioseguridad, debido a que entre las bacterias conservadas se encuentran patógenos transmitidos por alimentos, cuya vía de infección es la oral y requieren una mayor contención en su manipulación. Se siguieron los criterios establecidos por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), 4<sup>o</sup> edición, que establece 4 niveles en la complejidad de los laboratorios, basados en una combinación de características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos o potencialmente patógenos de los distintos grupos de riesgo. Las pautas adoptadas fueron:

- El acceso al laboratorio fue reducido sólo al personal capacitado, con guardapolvo manga larga completamente abrochado y se evitó la entrada durante el manejo de microorganismos.
- Se procedió a la limpieza y desinfección de la mesada de trabajo al inicio y al finalizar la actividad. Para ello se utilizó papel absorbente humedecido con agua, luego papel absorbente seco y por último algodón y alcohol al 70 %; luego de unos minutos se prendió el mechero.
- Se utilizaron guantes durante la manipulación y lavado de las manos de forma regular y apropiada, luego de manipular materiales biológicos peligrosos, al inicio y antes de abandonar el laboratorio, etc. El protocolo de lavado de manos fue el siguiente: formar espuma abundante con el jabón y se frota bien las manos, durante un mínimo de 10 segundos; a continuación enjuagar en agua limpia y secar con papel absorbente. Como el grifo es manual fue cerrado con papel absorbente, para evitar que se vuelvan a contaminar las manos ya lavadas.
- Para la disposición de los residuos líquidos, tips, eppendorf y pipetas que contenían material patógeno o potencialmente patógeno se utilizaron recipientes con alcohol al 70 % o lavandina al 1 %, identificado como en la figura 12 :



Figura 12: Recipiente para descartar tips contaminados

- En el caso de cajas de Petri con cultivos microbianos, se identificaron como residuos con patógenos y esterilizaron en autoclave, previo al lavado del material.
- El material de vidrio roto se depositó en un recipiente destinado para ello, correctamente identificado, no junto con los residuos comunes.

## 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se basó en determinar si existían diferencias significativas entre las medias del número de unidades formadoras de colonias para las cepas del ensayo sometidas a dos métodos de conservación a través del tiempo.

La variable “número de unidades formadoras de colonias” es una variable discreta con una distribución de probabilidades de Poisson, por lo que los datos se transformaron a logaritmos.

Para el Análisis Descriptivo e Inferencial se utilizó el software estadístico InfoStat, versión 2015.

Se realizaron pruebas de hipótesis para diferencia de medias y se aplicó el Análisis de la Varianza (ADEVA) para un diseño polifactorial que responde al siguiente modelo:

$$Y_{ijl} = \mu + \alpha_j + \beta_l + (\alpha\beta)_{jl} + \varepsilon_{ijl}$$

$j = 1; 2$   
 $l = 1; 2; \dots b$   
 $i = 1, 2, 3$

Las cepas incluidas en el estudio fueron 12.

Los métodos de conservación (j) son dos: Método Alternativo y Método CRYOBANK.

Los tiempos (l) fueron: 0, 1 día, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 15 meses.

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento combinado (i)

Hipótesis planteadas:

$H_0$  = Existe igualdad de medias en el número de microorganismos conservados (UFC/mL) para ambos métodos.

$H_a$  = Existe diferencia de medias en el número de microorganismos conservados (UFC/mL) para ambos métodos.

Para cada cepa se realizó un Análisis Descriptivo e Inferencial. (Ver Anexos)

- Análisis Descriptivo:

Tiene por objeto poner de manifiesto la estructura y regularidades existentes en la colección de datos que se somete a estudio (patrón de comportamiento de los datos). Se ocupa de la obtención, organización y análisis de conjuntos de datos de variables que han sido medidas, así como de la presentación de la información de modo que resulte de manera objetiva.

- Análisis Inferencial:

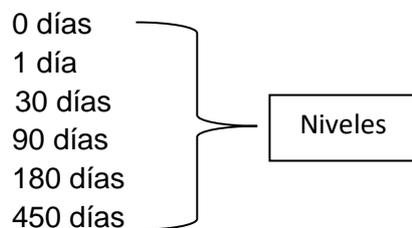
Comprende un conjunto de métodos mediante los cuales se obtienen generalizaciones o se toman decisiones sobre la base de una información parcial o incompleta (datos muestrales), que ha sido obtenida previamente por medio de técnicas descriptivas.

Los valores de probabilidad inferiores a 0,05 fueron considerados significativos.

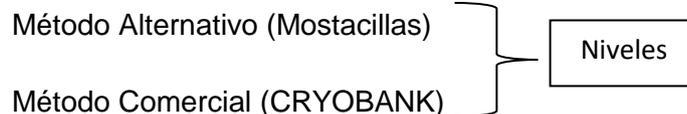
Para la comparación de medias que resultaron diferentes se realizó un test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

La variable dependiente fue el logaritmo de UFC/mL, los factores a estudiar fueron:

• Tiempo:



• Método de conservación:



Para determinar si los valores medios de ambos métodos eran iguales se utilizó la prueba de t (Student) para muestras independientes ( $\alpha = 0,05$ ). En los casos en que la prueba bilateral fue significativa (rechazo de hipótesis nula) se realizó una prueba unilateral determinando cuál de las medias de los métodos considerados era mayor.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1. MEDIOS DE CULTIVO

La descripción de las características culturales de cada cepa, previo y a los 6 meses de su conservación, se muestran a continuación:

3.1.1. Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS): las bacterias lácticas se observan colonias blanquecinas, circulares y cremosas, tal como se muestra en la figura 13.



Figura 13: Agar MRS, Bacterias Lácticas

3.1.2. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD): las colonias típicas de *Salmonella*, circulares con centro negro, se observan en la figura 14.



Figura 14: Agar XLD, *Salmonella*

3.1.3. Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa-Sacarosa (Agar EMB): en el caso de *Escherichia coli* las colonias se observaron de color verdoso con brillo metálico, con el centro negro-azulado como se observa en la figura 15. Las colonias de *Enterobater sp* fueron mucosas con el centro pardo-grisáceo.

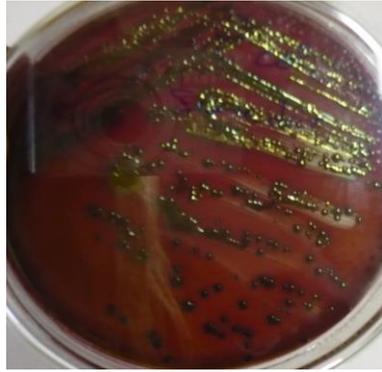


Figura 15: Agar EMB, *E. coli*

3.1.4. Medio Mossel: *Bacillus subtilis* presentó colonias blanquecinas sin halo de precipitación, como se muestra en la figura 16.



Figura 16: Medio Mossel, *Bacillus subtilis*

3.1.5. Agar Baird Parker: sobre el medio de cultivo opaco, por su contenido en yema de huevo, las colonias de *Staphylococcus* se muestran negras, brillantes y rodeadas de un doble halo blanquecino, como se observa en la figura 17.



Figura 17: Agar Baird Parker, *Staphylococcus aureus*

3.1.6. Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC): las colonias circulares, incoloras y consistencia cremosa, típicas de *Escherichia coli* O157:H7, se muestran en la figura 18.



Figura 17: Agar Mac Conkey Sorbitol, *Escherichia coli* O157:H7

3.1.7. Agar Palcam: como se observa en la figura 18, las colonias presentaron coloración verdosa con halo negro, típicas de *Listeria sp.*



Figura 18: Agar Palcam, *Listeria monocytogenes*

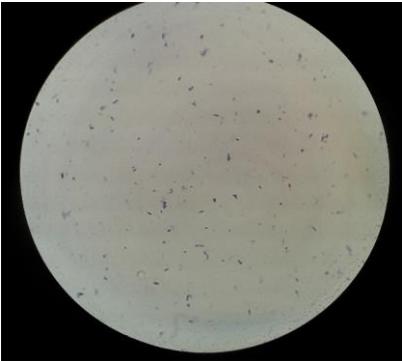
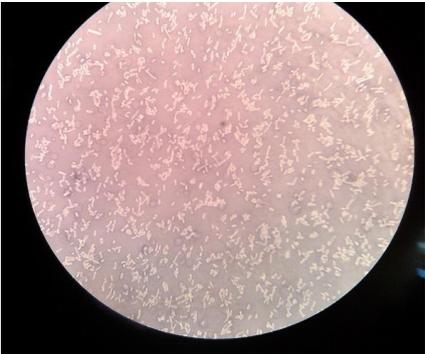
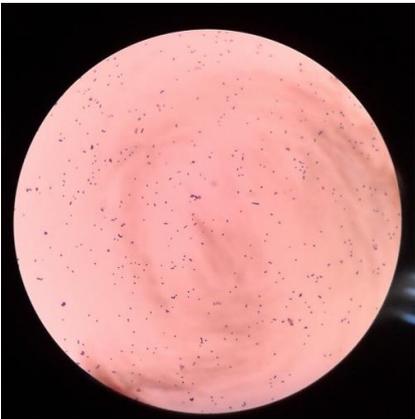
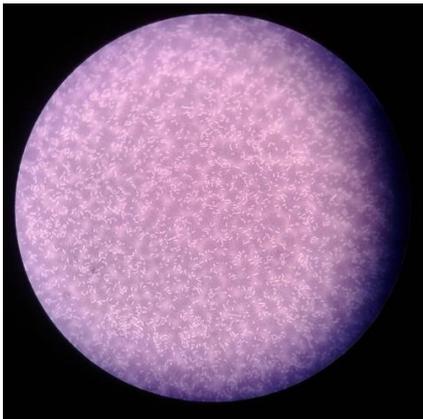
### 3.2. CONTROL DE PUREZA

Las características culturales, morfológicas, tinción de Gram y dos pruebas bioquímicas (catalasa y movilidad) de cada cepa se muestran en la Tabla 7:

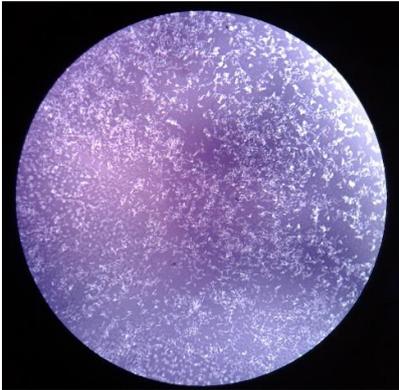
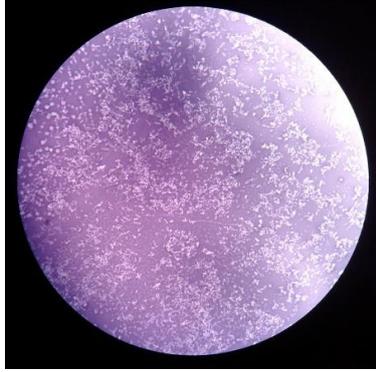
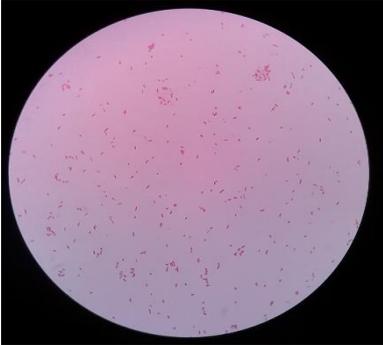
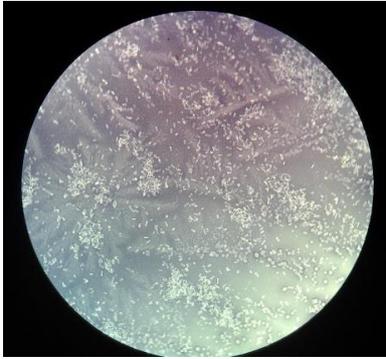
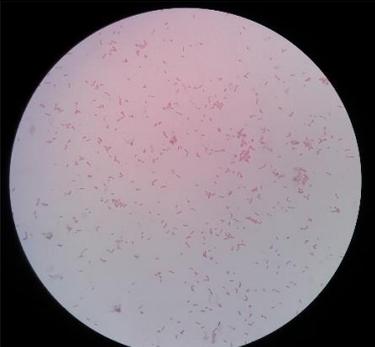
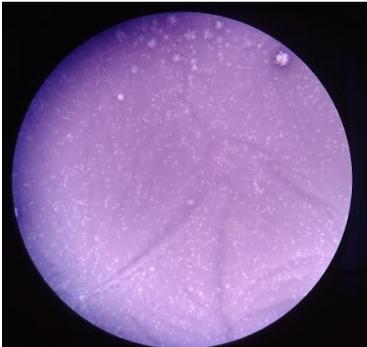
Tabla 7. Tinción de Gram, características culturales, morfológicas y pruebas bioquímicas de las cepas en estudio

| CEPA                                       | TINCIÓN GRAM | TINCIÓN NEGATIVA                                   | CATALASA | MOVILIDAD                         |
|--|--------------|--|----------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i>                   | +            | Bastones con endospora interior, sin deformaciones | +        | Móvil                             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>               | +            | Cocos, diplococos, racimos                         | +        | Móvil                             |
| <i>Listeria monocytogenes</i>              | +            | Bastones delgados                                  | +        | Móvil a 25 °C<br>No móvil a 37 °C |
| <i>Escherichia coli</i><br>cepa 2          | -            | Bastones delgados                                  | +        | Móvil                             |
| <i>Escherichia coli</i><br>cepa 26         | -            | Bastones delgados                                  | +        | Móvil                             |
| <i>Enterobacter sp.</i><br>cepa 10         | -            | Bastones pequeños y delgados                       | +        | Móvil                             |
| <i>Escherichia coli</i><br>O157:H7         | -            | Bastones delgados                                  | +        | Móvil                             |
| <i>Salmonella</i><br>cepa 11               | -            | Bastones delgados                                  | +        | Móvil                             |
| <i>Salmonella</i><br>cepa 12               | -            | Bastones   | +        | Móvil                             |
| <i>Bacteria</i><br>ácido-láctica<br>cepa C | +            | Cocos, en pares y en cadena                        | -        | No móvil                          |
| <i>Bacteria</i><br>ácido-láctica<br>cepa K | +            | Bastones   | -        | No móvil                          |
| <i>Bacteria</i><br>ácido-láctica<br>cepa L | +            | Cocos  | -        | No móvil                          |

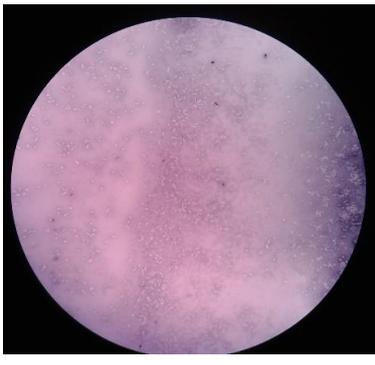
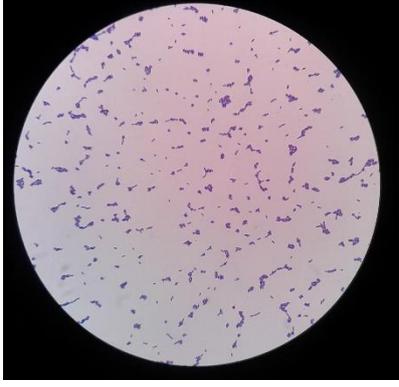
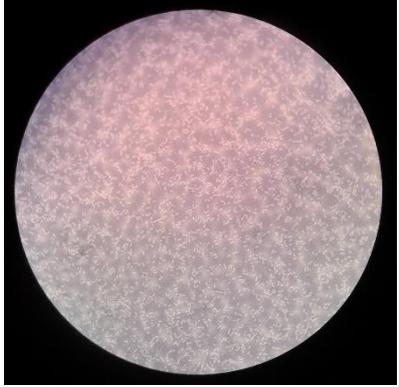
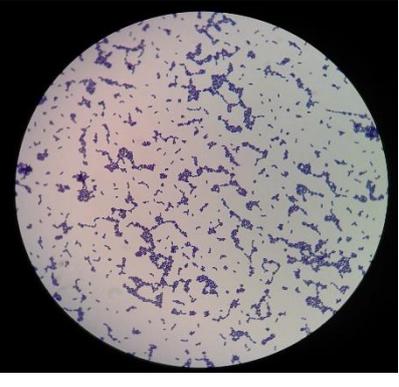
En la figura 19 se muestran las observaciones al microscopio óptico de la Tinción de Gram y Tinción Negativa o con Nigrosina:

| CEPA                          | TINCIÓN GRAM  | TINCIÓN NEGATIVA   |
|-------------------------------|---|--|
| <i>Bacillus subtilis</i>      |    |    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  |   |   |
| <i>Listeria monocytogenes</i> |  |  |

Continua

| CEPA                               | TINCIÓN GRAM  | TINCIÓN NEGATIVA  |
|------------------------------------|---|---|
| <i>Escherichia coli</i><br>cepa 2  |    |     |
| <i>Escherichia coli</i><br>cepa 26 |   |    |
| <i>Enterobacter sp.</i><br>cepa 10 |  |  |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7    |  |   |

Continua

| CEPA                                    | TINCIÓN GRAM  | TINCIÓN NEGATIVA   |
|---|---|--|
| <i>Salmonella</i><br>cepa 11            |    |    |
| <i>Salmonella</i><br>cepa 12            |   |   |
| <i>Bacteria ácido-láctica</i><br>cepa C |  |  |
| <i>Bacteria ácido-láctica</i><br>cepa K |  |  |

Continua

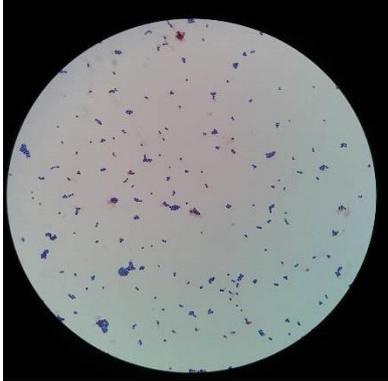
| CEPA                                    | TINCIÓN GRAM  | TINCIÓN NEGATIVA   |
|---|---|--|
| <b>Bacteria ácido-láctica</b><br>cepa L |  |  |

Figura 19: Tinción de Gram y Tinción negativa o con Nigrosina

Las características culturales, morfológicas y bioquímicas analizadas a los 6 meses de su conservación fueron idénticas a las de las cepas originalmente conservadas.

### 3.3. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

#### 3.3.1. Control de la calidad de medios de cultivo

- Prueba de esterilidad: no se obtuvo desarrollo microbiano en las cajas utilizadas como control, en ninguno de los lotes de cajas con medio de cultivo preparado, por lo que fueron aptos para su utilización.
- Control de crecimiento de microorganismos: los controles positivos de cada medio de cultivo mostraron las características típicas de cada cepa, de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.

3.3.2. Control de la calidad microbiológica ambiental: los resultados obtenidos, luego de incubar a 30 °C placas de Petri con Agar para Recuento, abiertas durante 15 minutos (figura 20) se muestran en el gráfico 3.

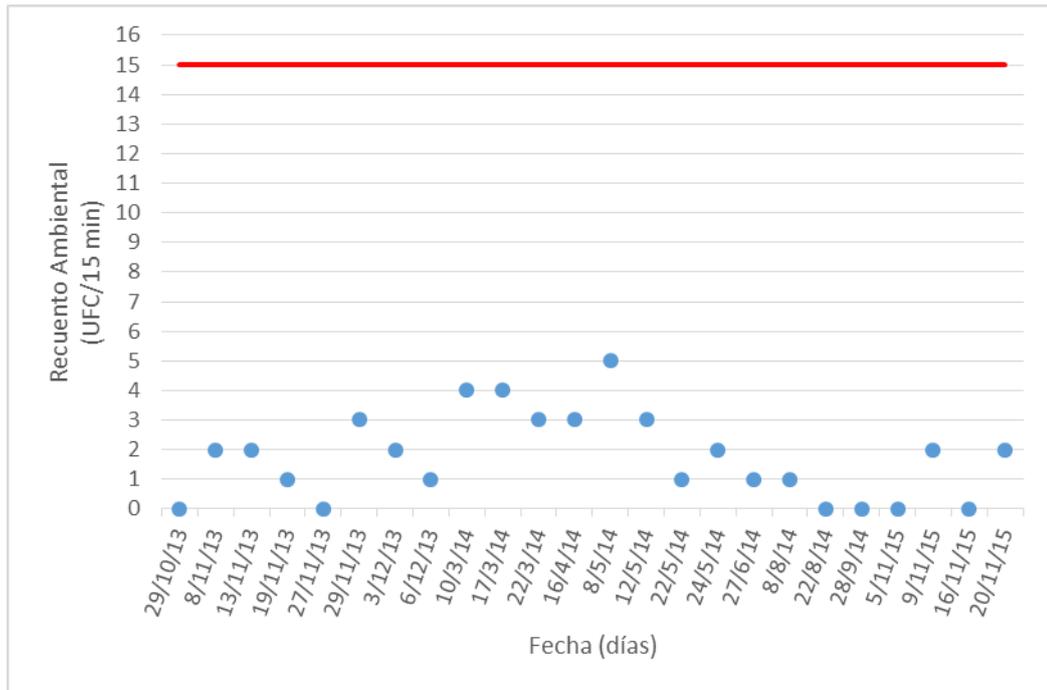


Gráfico 3: Recuento ambiental en 15 minutos

Como se observa en el gráfico anterior los valores hallados de UFC/15 minutos fueron inferiores a 15, en todos los ciclos de trabajo, límite definido internamente por el laboratorio.

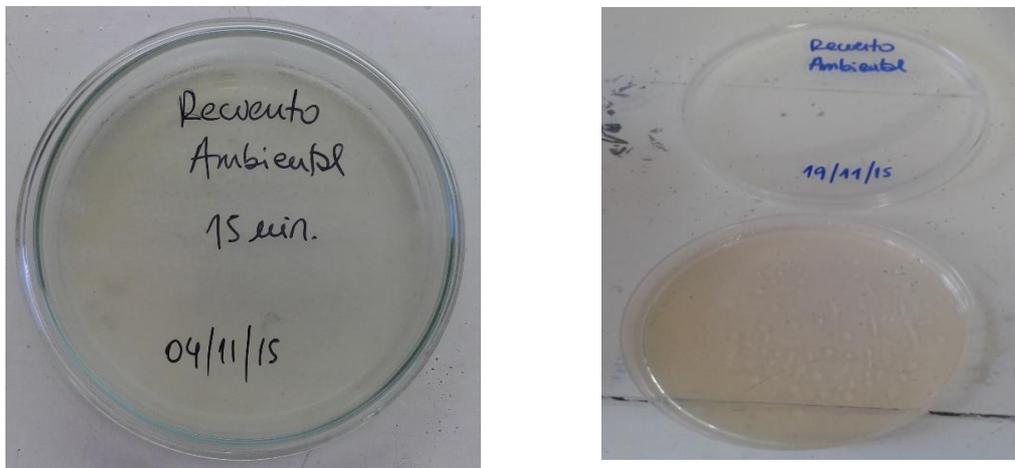


Figura 20: Cajas de Petri para Recuento ambiental

3.3.3. Control de esterilización: para determinar la efectividad del proceso de esterilización, en todos los ciclos realizados se empleó una tira indicadora, figura 21, que al cambiar el color, como se observa en la figura 22, permitió determinar que todos los medios de cultivo, agua peptonada, tips, etc., fueron correctamente esterilizados.



Figura 21: Tiras indicadoras de esterilización



Figura 22: Agua de dilución después del proceso de esterilización

3.3.4. Control de estufas de cultivo: el registro de las temperaturas de incubación de las estufas de 28 °C y 37 °C, se muestra en los gráficos 4 y 5.

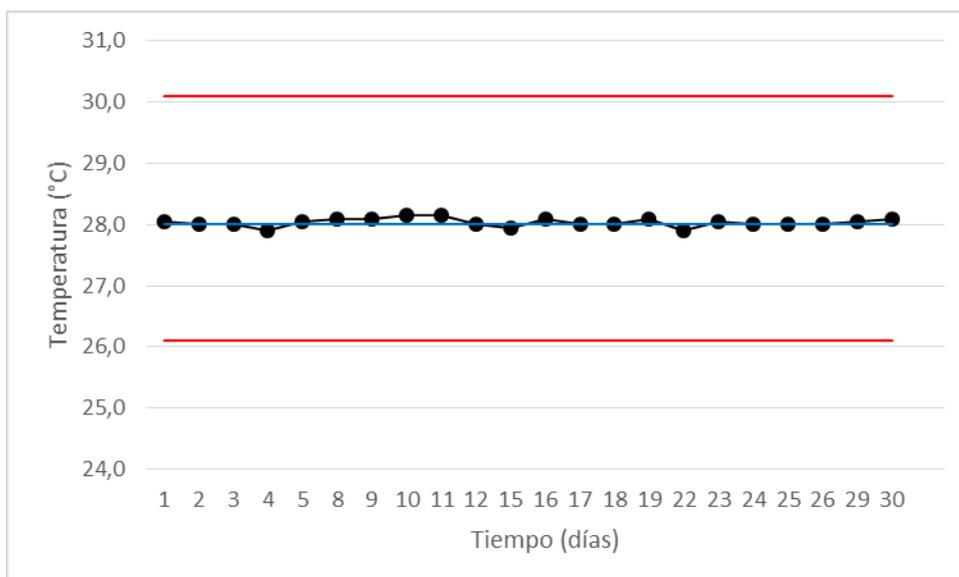


Gráfico 4: Registro de temperatura de incubación a 28 °C

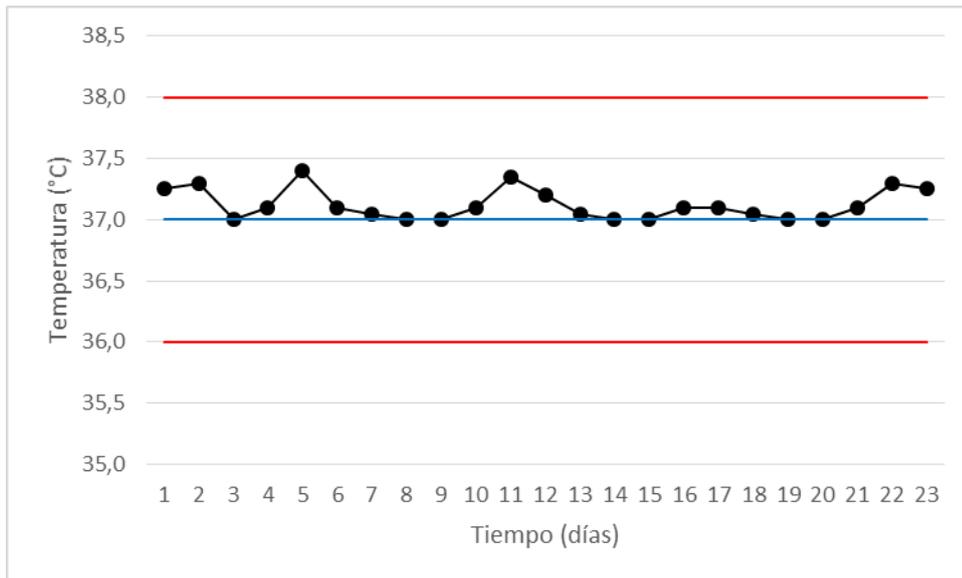


Gráfico 5: Registro de temperatura de incubación a 37 °C

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.4.1. Estadística Descriptiva

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para cada una de las cepas según el método de conservación, como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis Descriptivo de cada cepa según método de conservación.

| CEPA                                 | MÉTODO      | MEDIA (UFC/mL) | DESVIACIÓN TÍPICA (UFC/mL) | COEFICIENTE DE VARIACIÓN |
|--------------------------------------|-------------|----------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> cepa 2       | Alternativo | 5,74           | 1,82                       | 31,64                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,43           | 1,10                       | 24,91                    |
| <i>Escherichia coli</i> cepa 26      | Alternativo | 5,91           | 1,67                       | 28,28                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,85           | 0,85                       | 17,57                    |
| <i>Enterobacter</i> cepa 10          | Alternativo | 4,69           | 1,57                       | 33,48                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,91           | 1,12                       | 22,89                    |
| Bacteria Láctica cepa C              | Alternativo | 4,87           | 1,06                       | 21,65                    |
|                                      | CRYOBANK    | 5,04           | 0,66                       | 13,20                    |
| Bacteria Láctica cepa K              | Alternativo | 6,30           | 0,48                       | 7,69                     |
|                                      | CRYOBANK    | 6,21           | 0,34                       | 5,50                     |
| Bacteria Láctica cepa L              | Alternativo | 5,38           | 0,67                       | 12,46                    |
|                                      | CRYOBANK    | 5,66           | 0,37                       | 6,47                     |
| <i>Listeria monocytogenes</i> cepa 3 | Alternativo | 6,45           | 0,67                       | 10,46                    |
|                                      | CRYOBANK    | 6,82           | 0,38                       | 5,64                     |
| <i>Salmonella</i> cepa 11            | Alternativo | 3,94           | 1,07                       | 27,06                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,43           | 0,55                       | 12,47                    |
| <i>Salmonella</i> cepa 12            | Alternativo | 4,34           | 1,09                       | 25,16                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,19           | 0,65                       | 15,56                    |
| <i>Escherichia coli</i> O157 H7      | Alternativo | 4,14           | 1,23                       | 29,69                    |
|                                      | CRYOBANK    | 4,42           | 0,67                       | 15,08                    |
| <i>Bacillus subtilis</i>             | Alternativo | 5,91           | 0,99                       | 16,76                    |
|                                      | CRYOBANK    | 5,57           | 0,77                       | 13,81                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>         | Alternativo | 6,29           | 1,07                       | 16,98                    |
|                                      | CRYOBANK    | 6,45           | 0,91                       | 14,05                    |

### 3.4.2. Comparación de las medias de cada método con respecto al tiempo

El comportamiento de cada cepa conservada, por ambos métodos, con respecto al tiempo se muestra en los gráficos del 6 al 17.

Referencias:

| Tiempo          |            |
|-----------------|------------|
| Momento inicial | 0 meses    |
| 24 horas        | 0,03 meses |
| 1 mes           | 1 mes      |
| 3 meses         | 3 meses    |
| 6 meses         | 6 meses    |
| 15 meses        | 15 meses   |

### 3.4.2.1. *Escherichia coli*, cepa 2

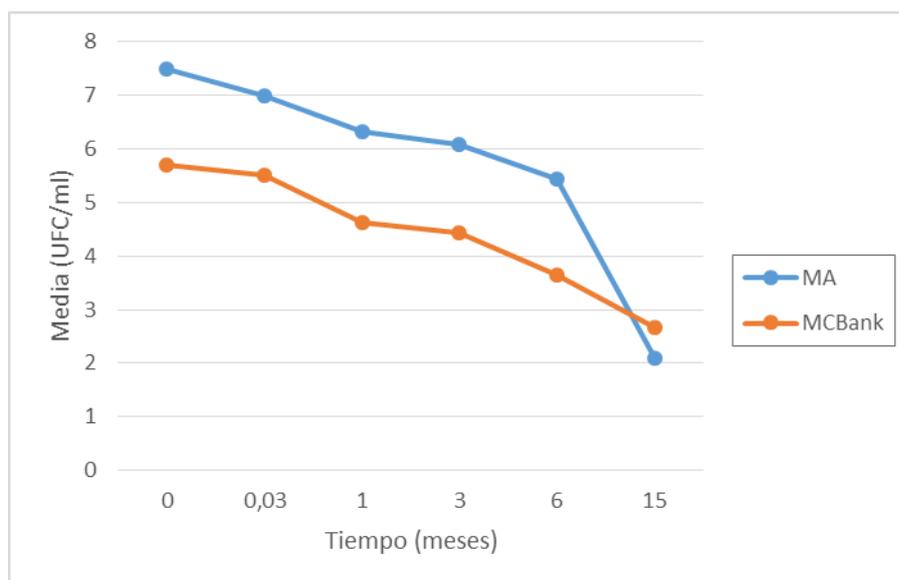


Gráfico 6: Comportamiento de *E. coli* cepa 2, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.2. *Escherichia coli*, cepa 26

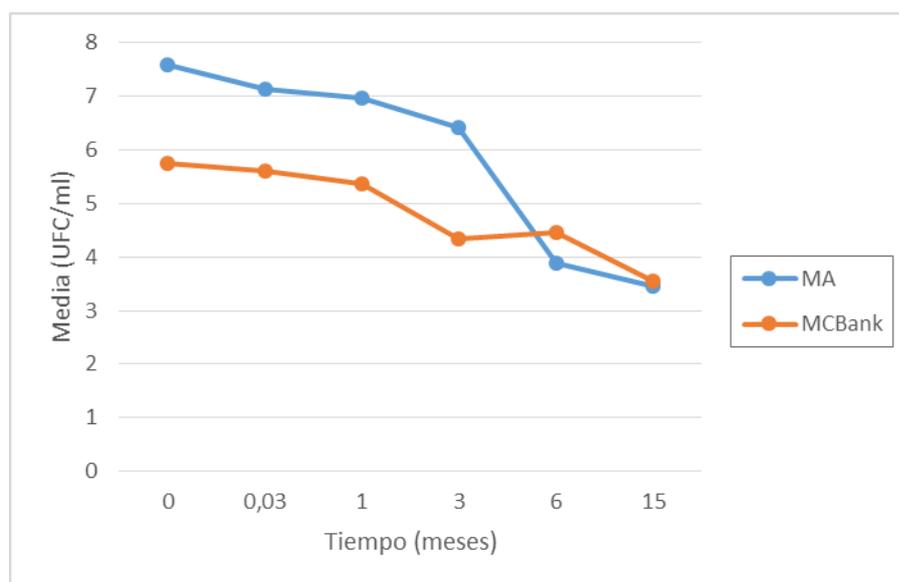


Gráfico 7: Comportamiento de *E. coli* cepa 26, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.3. Bacteria Láctica, cepa C

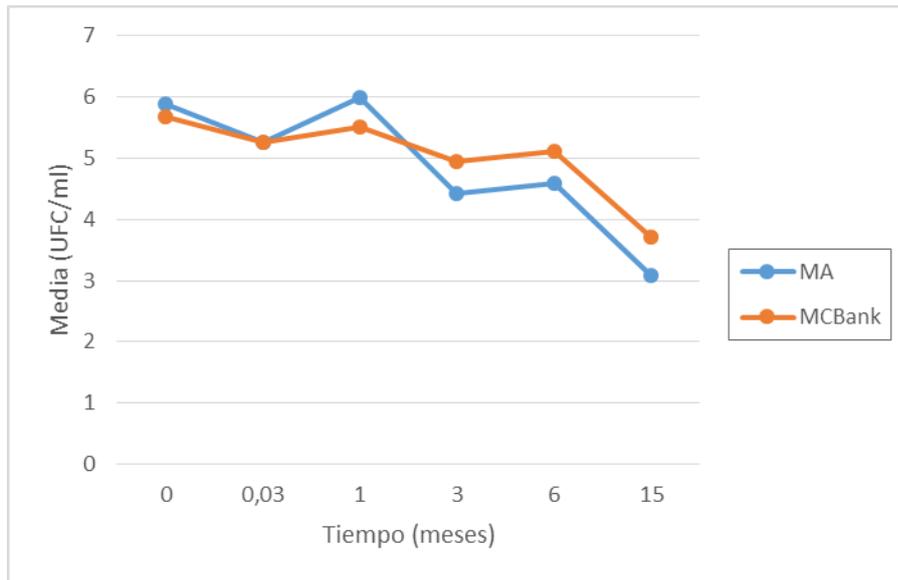


Gráfico 8: Comportamiento de BAL cepa C, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.4. Bacteria Láctica, cepa L

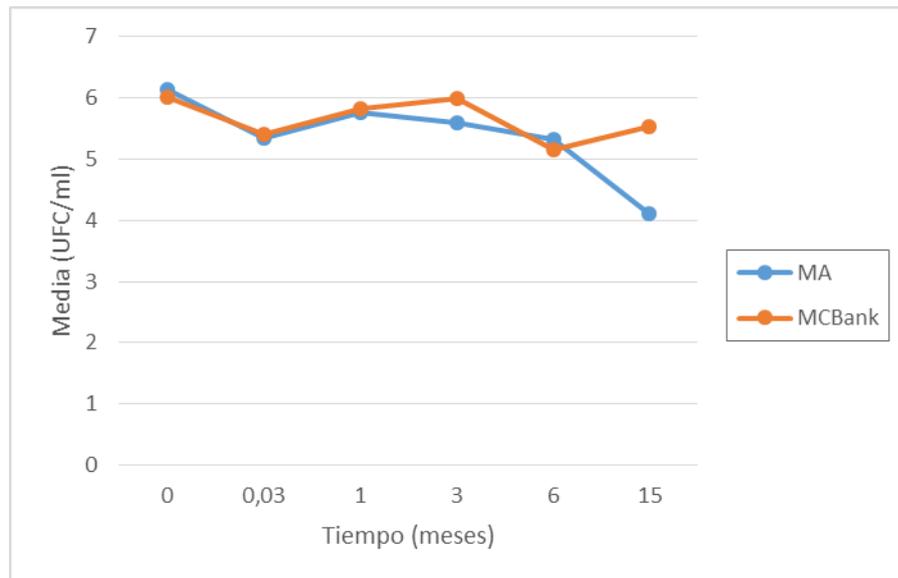


Gráfico 9: Comportamiento de BAL cepa L, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.5. *Salmonella*, cepa 11

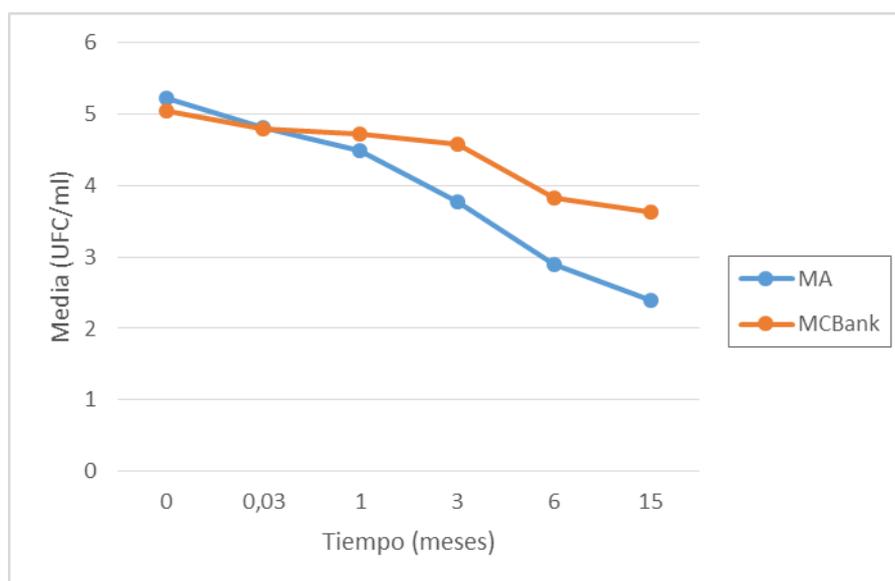


Gráfico 10: Comportamiento de *Salmonella* cepa 11, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.6. *Escherichia coli* O157:H7

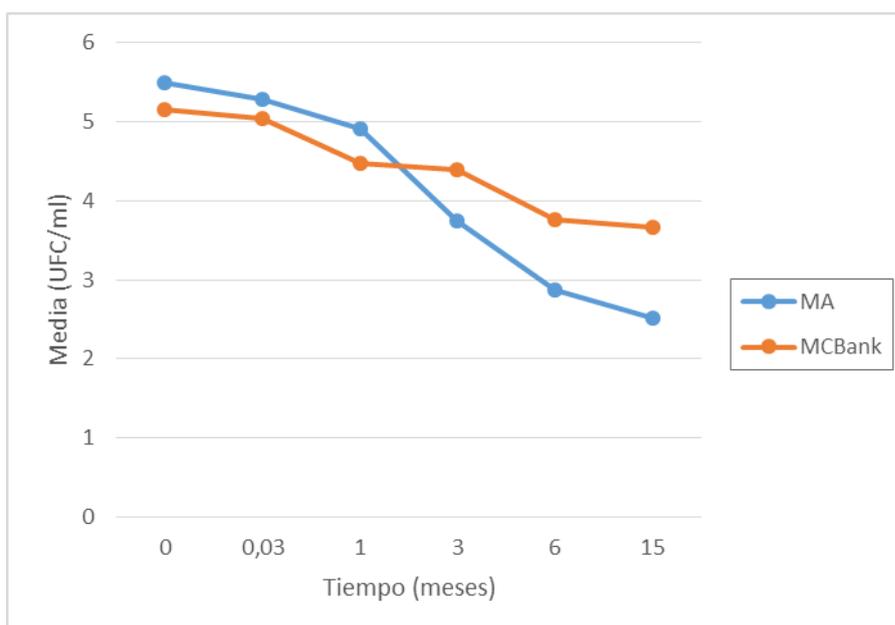


Gráfico 11: Comportamiento de *E. coli* O157:H7, por ambos métodos con respecto al tiempo

### 3.4.2.7. *Listeria monocytogenes*, cepa 3

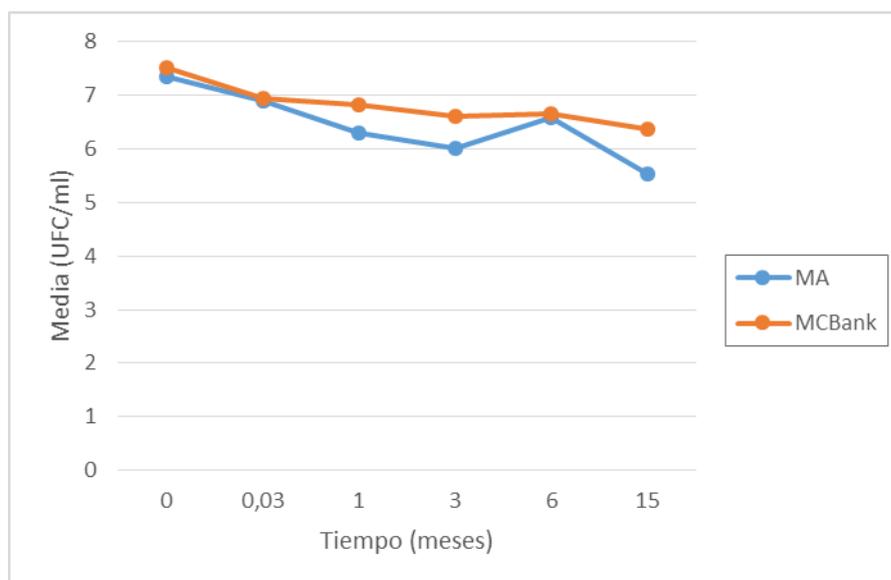


Gráfico 12: Comportamiento de *Listeria* cepa 3, por ambos métodos con respecto al tiempo

Se observa en los Gráficos 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, que el número de microorganismos conservados disminuye a medida que transcurre el tiempo. A los 15 meses las medias de los recuentos de ambos métodos no difieren (son iguales).

### 3.4.2.8. Bacteria Láctica, cepa K

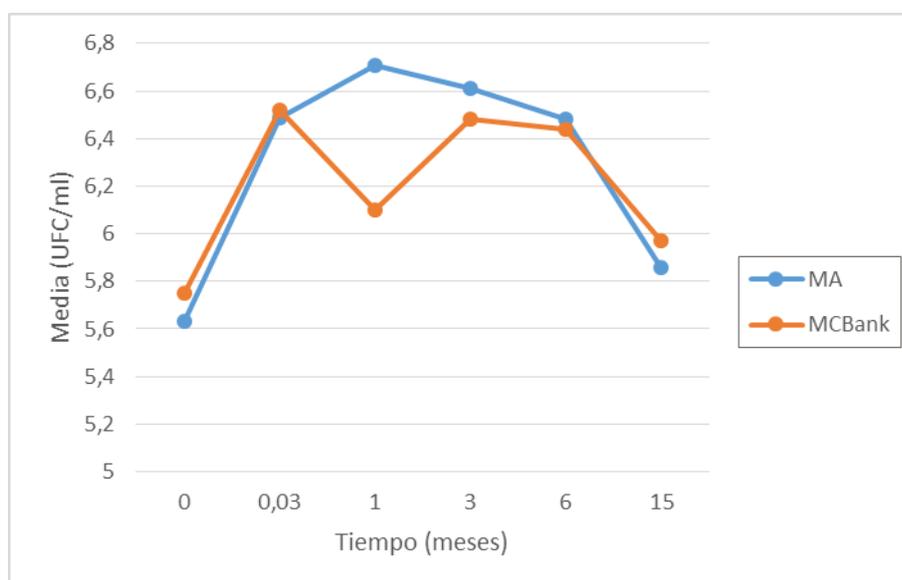


Gráfico 13: Comportamiento de BAL cepa K, por ambos métodos con respecto al tiempo

En el MA se encuentra la mayor media al mes y luego disminuye a los 15 meses. En el MCBank se observa la mayor media a los 0,03 meses (24 hs) luego disminuye al mes y vuelve a aumentar a los 3 meses para disminuir al tiempo 5 (15 meses).

### 3.4.2.9. *Enterobacter*, cepa 10

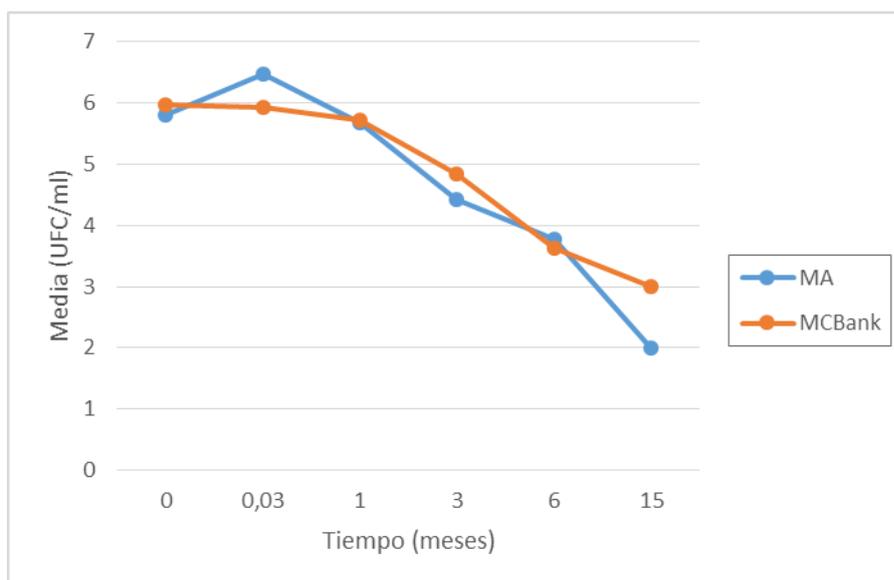


Gráfico 14: Comportamiento de *Enterobacter* cepa 10, por ambos métodos con respecto al tiempo

A los 15 meses, la media del MA, difiere de las demás. Al mes las medias son iguales para los dos tratamientos.

### 3.4.2.10. *Salmonella*, cepa 12

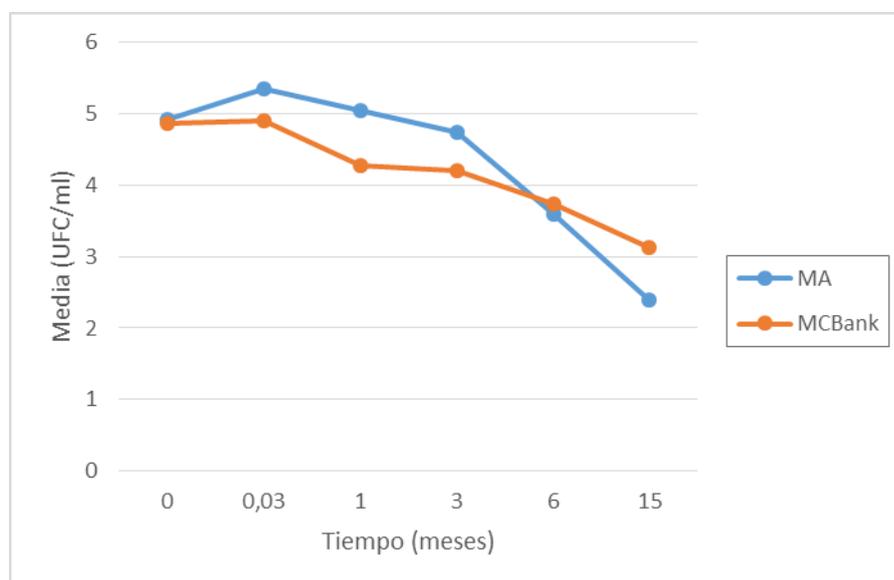


Gráfico 15: Comportamiento de *Salmonella* cepa 12, por ambos métodos con respecto al tiempo

Las medias de ambos métodos disminuyen en el tiempo, excepto a los 0,03 meses (24 hs) que para el MA y MCBank superan las medias del tiempo 0 (momento inicial).

### 3.4.2.11. *Bacillus subtilis*

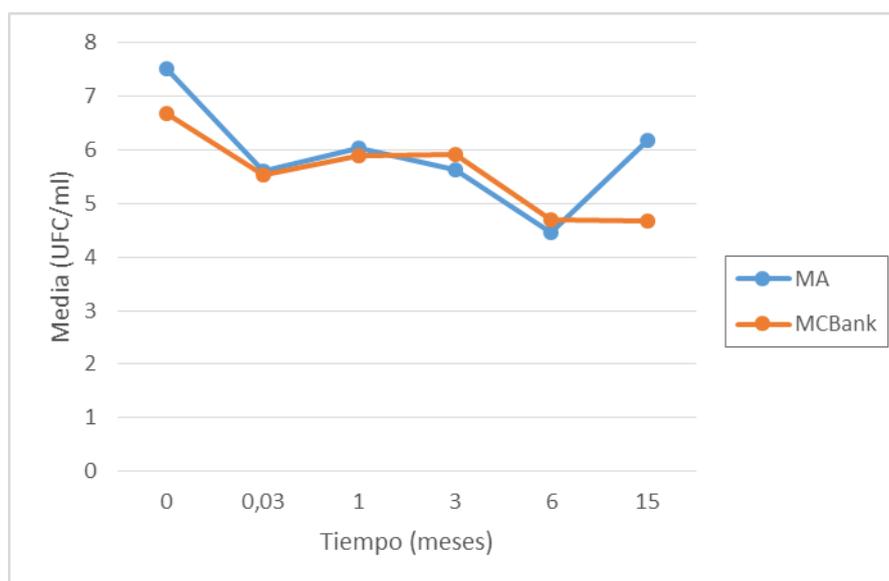


Gráfico 16: Comportamiento de *Bacillus subtilis*, por ambos métodos con respecto al tiempo

La menor media para el MA se observa a los 6 meses y para el MCBank a los 15 meses.

### 3.4.2.12. *Staphylococcus aureus*

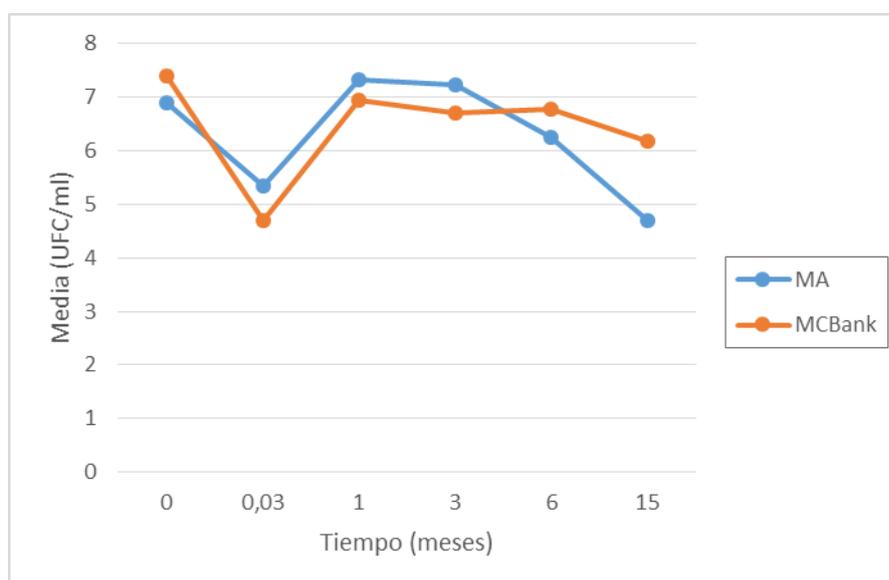


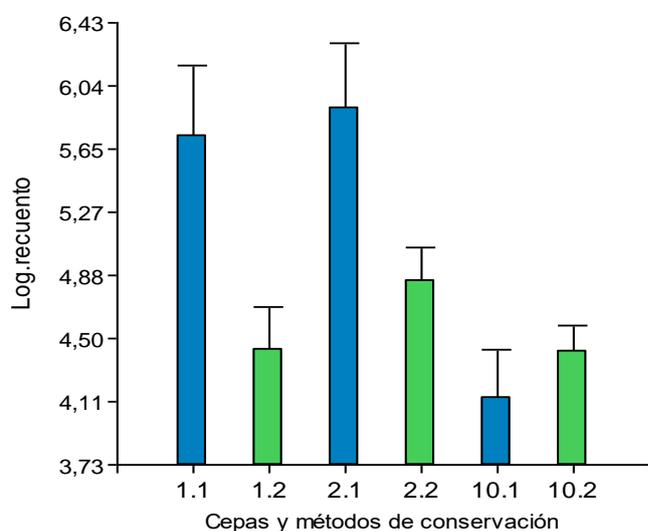
Gráfico 17: Comportamiento de *Staphylococcus aureus*, por ambos métodos con respecto al tiempo

Al mes se observa el mayor promedio para el MA y en el tiempo 0 para el MCBank.

### 3.4.3. Estadística Inferencial

Tabla 9. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano *E.coli*

| Grupo Bacteriano                  | Método de Conservación | Media (UFC/mL) | Desviación típica (UFC/mL) | Error típico de la media (UFC/mL) | Prueba de t para muestras independientes                                      |
|-----------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> . Cepa 2  | MA                     | 5,78           | 1,82                       | 0,43                              | p-valor 0,041<br>Prueba significativa<br>p-valor 0,007 para prueba Unilateral |
|                                   | MCBank                 | 4,43           | 1,10                       | 0,26                              |   |
| <i>Escherichia coli</i> . Cepa 26 | MA                     | 5,91           | 1,67                       | 0,39                              | p-valor 0,0238<br>Prueba significativa<br>p-valor 0,0119<br>prueba Unilateral |
|                                   | MCBank                 | 4,85           | 0,85                       | 0,20                              |   |
| <i>Escherichia coli</i> 0157:H7   | MA                     | 4,14           | 1,23                       | 0,29                              | p-valor 0,4044<br>Prueba no significativa                                     |
|                                   | MCBank                 | 4,42           | 0,67                       | 0,16                              |   |



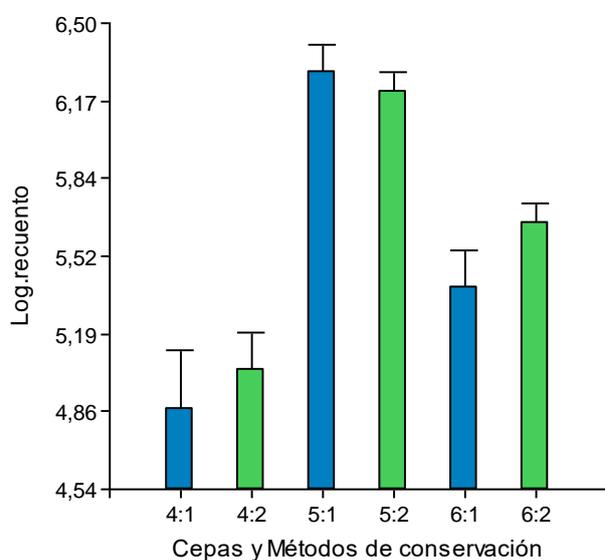
#### Referencias

- 1.1: *E. coli* Cepa 2 Método Alternativo
- 1.2: *E. coli* Cepa 2 Método CBank
- 2.1: *E. coli* 26 Método Alternativo
- 2.2: *E. coli* 26. Método CBank
- 10.1: *E. coli* 0157:H7: Método Alternativo
- 10.2: *E. coli* 0157:H7: Método CBank

Gráfico 18: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo *E. coli*

Tabla 10. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano Lácticas

| Grupo Bacteriano         | Método de Conservación | Media (UFC/mL) | Desviación típica (UFC/mL) | Error típico de la media (UFC/mL) | Prueba de t para muestras independientes  |
|--------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|---|
| Bacteria Láctica. Cepa C | MA                     | 4,87           | 1,06                       | 0,25                              | p-valor 0,5852<br>Prueba no significativa |
|                          | MCBank                 | 5,04           | 0,66                       | 0,16                              |   |
| Bacteria Láctica Cepa K  | MA                     | 6,30           | 0,48                       | 0,11                              | p-valor 0,5476<br>Prueba no significativa |
|                          | MCBank                 | 6,21           | 0,34                       | 0,88                              |   |
| Bacteria Láctica Cepa L  | MA                     | 5,38           | 0,67                       | 0,16                              | p-valor 0,1401<br>Prueba no significativa |
|                          | MCBank                 | 5,66           | 0,37                       | 0,09                              |   |



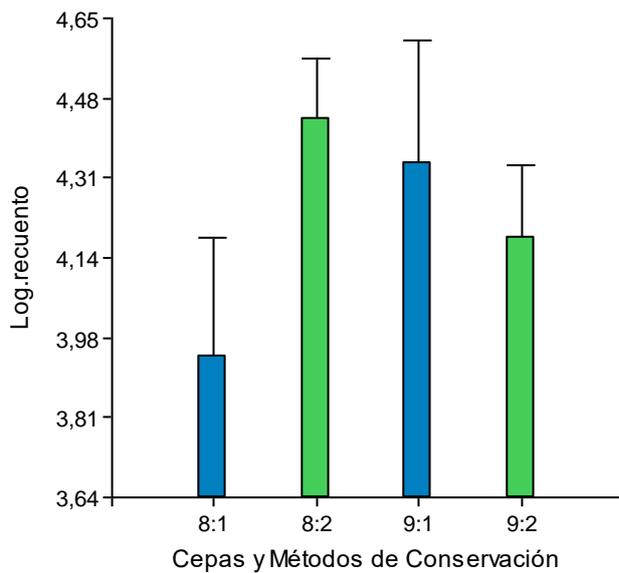
Referencias

- 4.1: Láctica Cepa C. Método Alternativo
- 4.2: Láctica Cepa C. Método CBank
- 5.1: Láctica Cepa K. Método Alternativo
- 5.2: Láctica Cepa K. Método CBank
- 6.1: Láctica Cepa L. Método Alternativo
- 6.2: Láctica Cepa L. Método CBank

Gráfico 19: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo Lácticas

Tabla 11. Estadística Inferencial para el Grupo Bacteriano *Salmonella*

| Grupo Bacteriano             | Método de Conservación | Media (UFC/mL) | Desviación típica (UFC/mL) | Error típico de la media (UFC/mL) | Prueba de t para muestras independientes  |
|------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Salmonella</i><br>Cepa 11 | MA                     | 3,94           | 1,07                       | 0,25                              | p-valor 0,0904<br>Prueba no significativa |
|                              | MCBank                 | 4,43           | 0,55                       | 0,13                              |   |
| <i>Salmonella</i><br>Cepa 12 | MA                     | 4,34           | 1,09                       | 0,27                              | p-valor 0,6016<br>Prueba no significativa |
|                              | MCBank                 | 4,19           | 0,65                       | 0,15                              |   |

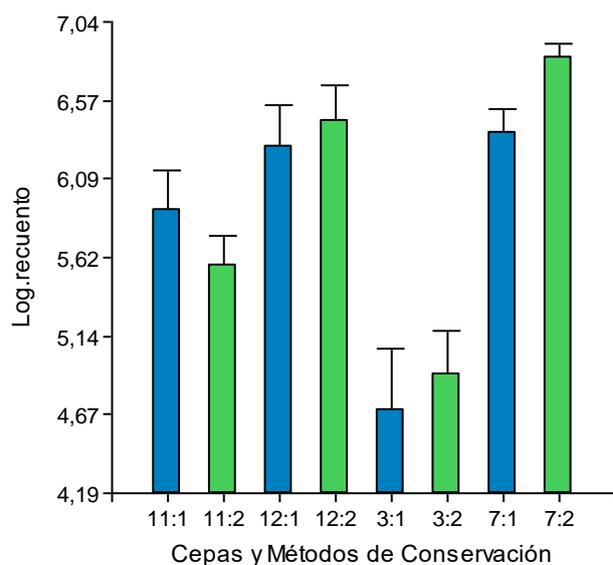


Referencias  
 8.1: *Salmonella* 11. Método Alternativo  
 8.2: *Salmonella* 11. Método CBank  
 9.1: *Salmonella* 12. Método Alternativo  
 9.2: *Salmonella* 12. Método CBank

Gráfico 20: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos del Grupo *Salmonella*

Tabla 12. Estadística Inferencial para *Enterobacter*, *Listeria*, *Bacillus* y *Staphylococcus*

| Grupo Bacteriano                        | Método de Conservación | Media (UFC/mL) | Desviación típica (UFC/mL) | Error típico de la media (UFC/mL) | Prueba de t para muestras independientes  |
|---|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Enterobacter</i><br>Cepa 10          | MA                     | 4,69           | 1,57                       | 0,37                              | p-valor 0,4044<br>Prueba no significativa |
|   | MCBank                 | 4,91           | 1,12                       | 0,26                              |   |
| <i>Listeria monocytogenes</i><br>Cepa 3 | MA                     | 6,45           | 0,67                       | 0,16                              | p-valor 0,05<br>Prueba no significativa   |
|   | MCBank                 | 6,82           | 0,38                       | 0,09                              |   |
| <i>Bacillus subtilis</i>                | MA                     | 5,91           | 0,99                       | 0,23                              | p-valor 0,2610<br>Prueba no significativa |
|   | MCBank                 | 5,57           | 0,77                       | 0,18                              |   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>            | MA                     | 6,29           | 1,07                       | 0,25                              | p-valor 0,6409<br>Prueba no significativa |
|   | MCBank                 | 6,45           | 0,91                       | 0,21                              |   |



Referencias

- 11.1: *Enterobacter* 10. Método Alternativo
- 11.2: *Enterobacter* 10. Método CBank
- 12.1: *Listeria* 3. Método Alternativo
- 12.2: *Listeria* 3. Método CBank
- 3.1: *B. subtilis*. Método Alternativo
- 3.2: *B. subtilis*. Método CBank
- 7.1: *S. aureus*. Método Alternativo
- 7.2: *S. aureus*. Método CBank

Gráfico 21: Logaritmo del recuento respecto a ambos métodos de *Enterobacter*, *Listeria*, *Bacillus* y *Staphylococcus*

Para *E. coli* O157:H7, BAL cepa C, cepa K y cepa L, *Salmonella* cepa 11 y cepa 12, *Enterobacter*, *Listeria*, *Bacillus* y *Staphylococcus*, las diferencias de las medias correspondientes a los recuentos fueron no significativas, es decir las medias del logaritmo del recuento (UFC/mL) son iguales cualquiera sea el método de conservación (no existieron evidencias estadísticas suficientes para rechazar la Hipótesis nula de igualdad de medias para un nivel de significancia de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ))

En el caso de las cepas de *E. coli* cepa 2 y 26, las medias son estadísticamente diferentes (se rechaza la Hipótesis nula de igualdad de medias para un nivel de significancia de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ )).

### 3.5. VIABILIDAD DE LAS CEPAS CONSERVADAS

El resultado del porcentaje de supervivencia para cada cepa, por ambos métodos, a los 6 y a los 15 meses, se muestra en la Tabla 13:

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de células a los 6 y 15 meses

| CEPA                            | MÉTODO      | % RECUPERACIÓN<br>6 MESES | % RECUPERACIÓN<br>15 MESES |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> cepa 2  | Alternativo | 71,20                     | 27,80                      |
|                                 | CRYOBANK    | 63,74                     | 47,71                      |
| <i>Escherichia coli</i> cepa 26 | Alternativo | 51,55                     | 45,78                      |
|                                 | CRYOBANK    | 77,66                     | 61,62                      |
| <i>Enterobacter</i> cepa 10     | Alternativo | 66,93                     | 34,46                      |
|                                 | CRYOBANK    | 61,24                     | 60,24                      |
| Bacteria Láctica cepa C         | Alternativo | 78,22                     | 56,74                      |
|                                 | CRYOBANK    | 90,18                     | 65,54                      |
| Bacteria Láctica cepa K         | Alternativo | 116,46                    | 89,03                      |
|                                 | CRYOBANK    | 112,38                    | 86,82                      |
| Bacteria Láctica cepa L         | Alternativo | 86,96                     | 67,58                      |
|                                 | CRYOBANK    | 85,61                     | 92,14                      |
| <i>Listeria monocytogenes</i>   | Alternativo | 87,36                     | 75,06                      |
|                                 | CRYOBANK    | 88,26                     | 84,43                      |
| <i>Salmonella</i> cepa 11       | Alternativo | 55,55                     | 47,34                      |
|                                 | CRYOBANK    | 75,98                     | 72,23                      |
| <i>Salmonella</i> cepa 12       | Alternativo | 73,50                     | 50,25                      |
|                                 | CRYOBANK    | 76,68                     | 65,00                      |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | Alternativo | 51,91                     | 50,78                      |
|                                 | CRYOBANK    | 70,26                     | 68,24                      |
| <i>Bacillus subtilis</i>        | Alternativo | 59,58                     | 82,50                      |
|                                 | CRYOBANK    | 61,31                     | 60,67                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | Alternativo | 85,38                     | 64,17                      |
|                                 | CRYOBANK    | 91,87                     | 83,99                      |

Todas las cepas conservadas presentan a los 6 meses un valor mayor al 50 % de recuperación, coincidiendo con lo referido por Smith (1996).

Como puede observarse resaltado en color verde, a los 6 meses, el MA supera el porcentaje de recuperación del CRYOBANK, lo que es positivo ya que es el método de referencia conocido y usado internacionalmente.

A los 15 meses las bacterias lácticas C, K y L, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* cepa 12, *E. coli* O157:H7, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* presentan un valor mayor al 50 %, siendo en algunos casos el porcentaje de recuperación del MA superior al Método CRYOBANK. Sin embargo en el caso de *E. coli* cepa 2 no se alcanza a recuperar el 50 %, (datos en rojo) por ninguno de los dos métodos y lo mismo sucede con el MA en el caso de las cepas *E. coli* cepa 26, *Enterobacter* y *Salmonella* cepa 11.

Las cepas conservadas por el Método Alternativo con mostacillas a - 20 °C, a los 6 meses de su preservación mantienen su pureza, estabilidad y presentan un valor de recuperación mayor al 50 %, valor recomendado por Smith (1996). De este modo puede garantizarse que la población sobreviviente se corresponde con la originalmente conservada, mantienen las propiedades de importancia de los cultivos y que se minimiza la ocurrencia de eventos genéticos. Como era de esperar, al término de los 15 meses el número de bacterias disminuyó significativamente. A pesar de ello, el porcentaje de recuperación alcanzó el 50 % para las cepas C, K, L de las BAL, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* cepa 12, *E. coli* O157:H7, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Respecto a las cepas 2 y 26 de *E. coli*, *Enterobacter* y *Salmonella* cepa 11, si bien no llegaron a dicho porcentaje de recuperación, el valor hallado fue de 28, 46, 34 y 47 %, respectivamente, lo que permite su recuperación.

Se aceptó la Hipótesis nula para *E. coli* O157:H7, BAL cepa C, K y L, *Salmonella* cepa 11 y 12, *Enterobacter*, *Listeria*, *Bacillus* y *Staphylococcus* y se rechazó en el caso de *E. coli* cepa 2 y 26.

De las 10 cepas para las cuales se aceptó la Hipótesis nula, 3 cepas presentan el mismo porcentaje de recuperación que el CRYOBANK y en el caso de *Bacillus subtilis* y Bacteria Láctica cepa C lo supera en el lapso de tiempo analizado.

El número de microorganismos conservados por congelación a - 20° C disminuye considerablemente a medida que transcurre el tiempo, al menos durante los 15 meses evaluados, por ambos métodos y bajo las condiciones analizadas.

Los resultados dispares para las diferentes cepas analizadas e incluso dentro de las mismas cepas puede deberse a una aleatoriedad en la adhesión de las bacterias a las mostacillas, en el Método Alternativo y en el CRYOBANK, en el momento de su conservación inicial.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Como se observa en los resultados las cepas conservadas por el método alternativo con mostacillas a - 20 °C, a los 6 meses, mantienen su pureza, estabilidad y presentan un valor de recuperación mayor al 50 %. Puede garantizarse que la población sobreviviente se corresponde con la originalmente conservada, mantienen sus propiedades y se minimiza la ocurrencia de eventos genéticos, de acuerdo a lo establecido por Weng Alemán (2005). Al término de los 15 meses el número de bacterias disminuye significativamente.

El método de conservación mediante criopreservación resulta adecuado y es, después del método de liofilización, el más conveniente para garantizar la viabilidad de bacterias en el tiempo. Es ampliamente utilizado en distintos trabajos científicos, tales como Rodríguez Peña y Torres Lozano (2006), Pimienta Sandoval y Vergara Ordogostia (2007) y Salazar G. y col. (2011). El método propuesto presenta la ventaja de ser accesible en cuanto a recursos económicos, a su empleo, y está al alcance de laboratorios, microbiólogos e investigadores cuya finalidad es la conservación bacteriana por diversos motivos.

Es escasa la bibliografía respecto a la efectividad de métodos de conservación bacteriana, principalmente de aquellos accesibles y de fácil utilización. Se propuso el uso de perlas de vidrio para la conservación de *Shigella*, observando una disminución en el número de bacterias conservadas, que coincide con los resultados encontrados en nuestro trabajo, sin embargo el número de bacterias recuperadas es inferior a nuestros resultados, aproximadamente 34 UFC/mL (Weng Alemán, 2013).

Parra Huertas y col. (2006) compararon distintos métodos de conservación, papel de filtro y criopreservación, en cepas de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, pertenecientes al banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) concluyendo que la criopreservación era el mejor método, con un porcentaje de recuperación mayor al 50 % a las 24 hs de conservado.

Según Arencibia y col. (2008) no se aconseja conservar en equipos que sólo alcancen temperatura de - 20 °C, ya que debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. A - 20 °C el daño que puede ocurrir en las células se debe a fluctuaciones de la temperatura, frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si bien no se dispone de un equipamiento que permita la conservación a - 70 °C, un vial de cada cepa perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos de la FCA se encuentra conservado a dicha temperatura en un Frezzer que se comparte con otra área. Sin embargo, hemos podido demostrar con el estudio realizado que es posible llevar a cabo la conservación a - 20 °C al menos 6 meses sin que se altere su pureza y estabilidad garantizando que la población sobreviviente se corresponde con la originalmente conservada, manteniendo las propiedades de importancia de los cultivos y que se minimiza la ocurrencia de eventos genéticos, de acuerdo a lo establecido por Weng Alemán (2005).

Burguet y Sierra (2012) demuestran que para el mantenimiento de cepas de referencia, especialmente *Brevundimonas diminuta*, conservadas por el método de congelación a - 70 °C, resulta conveniente emplear Caldo Triptona Soya como medio de crecimiento, leche descremada al 20% como sustancia lioprotectora y liofilización como método de conservación. Para verificar el sustento del cultivo realizaron control de la calidad mediante comprobación de pureza, viabilidad y estabilidad de las propiedades de interés. Los resultados obtenidos durante los 24 meses en que se llevó a cabo el estudio de estabilidad confirmaron que el método elegido brindaría una alternativa y solución al problema relacionado con la conservación de esta cepa.

Ortiz y col. (2016) evaluaron diferentes métodos de conservación para actinobacterias solubilizadoras de fósforo. Usaron métodos de congelación y liofilización por períodos de conservación a corto, mediano y largo plazo. Establecieron que la actividad solubilizadora de fósforo se mantuvo estable en los métodos de glicerol 30 % (p/v) y liofilización.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSION**

Por todo lo antes mencionado, se concluye que el método evaluado resguardó las características propias de las cepas estudiadas, el porcentaje de recuperación fue aceptable y presentó las ventajas de requerir insumos disponibles, a un costo accesible para laboratorios de microbiología y Colecciones de Cultivos Microbianos pequeñas, por lo que el Método Alternativo propuesto en la presente Tesis, con solución crioprotectora y mostacillas en viales tipo eppendorf, puede ser utilizado como una opción al Método CRYOBANK, internacionalmente reconocido, en lo que respecta a la conservación de microorganismos, al menos durante un año y medio

## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia D.F, Rosario L.A, Gámez R. 2008. Métodos Generales de Conservación de Microorganismos. Ed Finlay, Cuba. 14 p.
- Armstrong, F.B.1964. Isoleucine-valine requiring mutants of Salmonella typhimurium. Genetics; Vol. 50, 957 - 965 p.
- Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC). 2002. Diseño de un estudio de validación método cuantitativo. [<http://www.aoac.org/>]
- Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM). 2011. Micro-organisms sustainable use and access regulation international code of conduct (MOSAICC). [<http://bccm.belspo.be/projects/mosaic>]
- Blumberg HM, Rimland D, Kiehlbauch JA, Terry PM, Wachsmuth IK. 1992. Epidemiologic typing of Staphylococcus aureus by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes: elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-nontypeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible S. aureus isolates. J Clin Microbiol. 30 (2): 362 - 369 p.
- Brock, 1998. Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall. 8va Edición revisada. Madrid. España. 1063 p.
- Burguet N., Sierra N. 2012. Evaluación de una estrategia de conservación para *Brevundimonas diminuta*. Revista Vaccin Monitor, Vol. 1. 10 - 13 p.
- Cabeza Herrera, E. A. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. [en línea], Universidad de León. España. [[http://www.academia.edu/992789/Bacterias\\_%C3%A1cido-l%C3%A1cticas\\_BAL\\_aplicaciones\\_como\\_cultivos\\_estarter\\_para\\_la\\_industria\\_l%C3%A1ctea\\_y\\_c%C3%A1rnica](http://www.academia.edu/992789/Bacterias_%C3%A1cido-l%C3%A1cticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_l%C3%A1ctea_y_c%C3%A1rnica)], [Consulta: 10 Marzo 2015]
- Caktü K, Türkoglu EA. 2011. Microbial Culture Collections: The Essential Resources for Life. Gazi University Jopurnal of Science 24 (2): 175 - 180 p.
- Centro de Control y Prevención de enfermedades. Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4º Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos. 196 p.
- Collard, P. 1976. The development of Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. Ed. Reverte, México. 184 p.
- Copan. 1996. CRYOBANK™ Bacterial Cultures Freezing Systems. [<http://www.copanusa.com/products/lab-supplies/cryobank/>], [Consulta: 22 Octubre 2014]
- Cuesta Alicia, I. Validación de Métodos microbiológicos. Protocolos de validación de los métodos microbiológicos. Norma ISO 17025. 46 p.

- De Vero Luciana, Giudici Paolo. 2013. Significance and management of acetic acid bacteria culture collections. Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy. Vol. 2, 61 p.
- Frioni, L. 2005. Microbiología: Básica, Ambiental y Agrícola. Universidad de la República. Uruguay. 407 p.
- Garay E. 2006. Informe técnico sobre cepas de trabajo en el laboratorio de análisis microbiológico. Sociedad Española de Microbiología. España. 12 p.
- Garay E. 2010. El depósito de cepas en las Colecciones de Cultivos Microbianos. Actualidad. Vol. 49, 30 - 31 p.
- Gonzáles Rosa Amelia. 2006. Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana, Cuba. 30 p.
- García López M. D.; Uruburu Fernandez F. La conservación de cepas Microbianas. Sociedad Española de Microbiología. España. 16 p.
- Henry B.S. 1933. Dissociation in the genus Brucella. J Infect Disease. Vol. 52, 374 - 402 p.
- Hill, L.R. and Kirsop, B.E. 1991. Living Resources for Biotechnology. Bacteria. Cambridge. Cambridge University. p 186.
- IAÑEZ PAREJA, Enrique. 1998. Concepto e historia de la microbiología. [en línea], Universidad Nacional del Noroeste, Corrientes. [[http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/01\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/01_micro.htm)], [Consulta: 22 Octubre 2014]
- InfoStat, Software estadístico, versión 2015. [<http://www.infostat.com.ar/>]
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. 1996. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 620 p.
- Kirsop, B.E. and Doyle, A. 1991. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2nd edn. Academic Press. London.
- Kirsop, B.E. and Hawksworth, D.L. 1994. The biodiversity of microorganisms and the role of Microbial Resource Centres. W.F.C.C
- Labeda David. P. Culture Collections: an essential resource for Microbiology. Bergey's Manual. Vol. 1, 111 - 113 p.
- Larpent, J.P. 1995. Las bacterias lácticas. ICMSF. Editorial Acribia, Zaragoza. España, Vol. 2, 3 - 17 p.
- Lindsay I. Sly. 1998. Australian Microbial Resources. Microbiology Australia, Vol. 19 (1), 27 - 35 p.

- Ligia Consuelo Sánchez Leal, Lucía Constanza Corrales Ramírez. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Revista NOVA, Vol. 3 nro 4. 29 p.
- Llop, Alina; Fernández, C.; Moliner, L.; Otero, A.; Alfonso, Marta; Iglesias, E.; Menéndez, J.C. 1998. Colecciones de organismos biológicos típicos y biomoléculas relacionadas. Cuba
- Lyhs, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. 77 p.
- Malik K A. 1991. The role of culture collections to safeguard nature's microbiological resources. Studies in Environmental Science, Vol. 42, 359 - 367 p.
- Mateos, P. 2014. Generalidades y desarrollo histórico de la microbiología. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. 30 p.
- NOVA, Publicación Científica en Ciencias Biométricas. 2005. [en línea] Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 3 (4) [[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA\\_12/ARTORIG2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA_12/ARTORIG2_4.pdf)], [Consulta: 12 Octubre, 2016].
- Ordoñez Parra, María Andrea, Rojas Salazar Diana Marcela. 2007. Diseño y elaboración de una guía preliminar para la validación de métodos microbiológicos estándar. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana – Facultad de Ciencias Dpto. De Microbiología. Bogota DC. 68 p.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. [[www.oecd.org](http://www.oecd.org)]
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2011. Criterios específicos para la evaluación y acreditación de laboratorios que llevan a cabo ensayos microbiológicos. [<http://www.oaa.org.ar/>]
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2011. Guía para la validación de métodos microbiológicos. [<http://www.oaa.org.ar/>]
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2011. Política y criterios para la participación en ensayos de aptitud/ comparaciones interlaboratorios. [<http://www.oaa.org.ar/>]
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2013. Guía para la validación de métodos de ensayo. [<http://www.oaa.org.ar/>]
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2013. Programa para el monitoreo de las buenas prácticas de laboratorio (BPL). [<http://www.oaa.org.ar/>]
- Organización Internacional de Estandarización (ISO 16140). 2003. Microbiología de los alimentos y piensos telas - Protocolo para la validación de métodos alternativos.
- Ortega González, Rodríguez Martínez, Zhurbenko. 2010. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, Vol. 48, nro 2. 14 p.

- Ortiz y col. 2016. Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 18, nro 2. 32 - 39 p.
- Parra Huerta, Pérez Casas, Bernal Morales, Suárez Moreno, Montoya Castaño. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Revista NOVA, Vol. 4, nro 5. 39 - 49 p.
- Párraga Estrada y Pilla Tituaña. 2013. Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 41 p.
- Pimienta Sandoval y Vergara Ordogostia, 2007. Caracterización e identificación de los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño utilizando leche de vaca de dos regiones diferentes. Universidad de La Salle, Facultad de Ingeniería. Bogotá. 67 p.
- Porter, J.R. 1976. The World View of Culture Collections. En: The Role of Culture Collections in the Era of Molecular Biology. R.R.Colwell (ed.). American Society for Microbiology. Washington.
- Rodríguez Peña y Torres Lozano, 2006. Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Universidad de la Sabana, Facultad de Ingeniería. Bogotá. 76 p.
- Revista Cubana de Medicina Tropical. 2005 [en línea]. Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kourí. Ciudad de la Habana, Cuba. 57 (3). [[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=0375-076020050003&script=sci\\_issuetoc](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=0375-076020050003&script=sci_issuetoc)], [Consulta: 12 Diciembre, 2014].
- Ruiz Mariana, Molina J. 2015. Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias. [en línea] Universidad Nacional Autónoma de México, [[www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html)], [Consulta: 10 Diciembre 2014].
- Salazar G, Uribe E, Aguilar C, Klotz B. 2011. Bioconservación de pescado fresco empacado al vacío mediante la utilización de extractos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas. Revista Alimentos Hoy, Vol. 20, nro. 24. 8 - 22 p.
- Sly, L. 1992. Maintenance and Preservation of Microbial Cultures in a Laboratory Culture Collection. NATA Technical Note nro.14. 1 - 16 p.
- Smith, D. 1996. Quality Systems for Management of Microbial Collections. Ch.5. Culture Collections to Improve the Quality of Live, Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections. Veldhoven, The Netherlands. 137 - 143 p.
- Smith, D. and Onions, A.H.S. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2nd ed. IMI Technical Handbooks nro. 2, 122 p.
- Smith, D. 2000. Culture Collection Function and Quality Management. Curso de Gerencia y Mantenimiento de Colecciones de Cultivos, Cuba.

- Snell, J.J.S. 1991. General Introduction to Maintenance Methods. En: Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. B.E. Kirsop and A. Doyle (eds). 2nd ed. Academy Press. London, 21 - 30 p.
- Snell, J.J.S. and Kocur, M. 1991. Maintenance of Bacteria in Gelatin Disc. En: Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. B.E. Kirsop and A. Doyle (eds). 2nd ed. Academy Press. London, 51 - 56 p.
- Stackebrandt, E. 1994. Uncertainties of Microbial Diversity, in Microbial Diversity and the Role of Microbial Resource Centres, WFCC.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I, Lozo, J. (2006). Potencial de las bacterias ácido lácticas aisladas de nichos naturales específicas para la producción y conservación de alimentos. Revista Internacional de Microbiología Alimentaria, Vol. 112, nro. 3. 230 - 235 p.
- Toselli R J, Der Ohannesian M, Cheminet G. Gestión interna de las cepas utilizadas como material microbiológico de referencia en un laboratorio de servicios acreditado bajo Norma ISO/IEC 17025. V IBERLAB.
- Meylín Ortega González, Claudio Rodríguez Martínez, Raisa Zhurbenko. Validación de métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos y aguas. 2010. Métodos cualitativos. Revista cubana de Higiene y epidemiología 48 (2) 162 - 176 p.
- ten Kate, K.1995. 'Access to ex-situ Collections: Resolving the Dilemma?' Global Biodiversity Forum, Jakarta, 4/5 November, 1995. WRI/IUCN/ACTS book on Access.
- Weng Alemán Z., Díaz Rosa O E, Alvarez Molina I. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Revista Cubana Higiene y Epidemiología, Vol. 43 nro. 3. 1 - 4 p.
- Weng Alemán Z., et all. 2011. Pseudomonas spp. y Staphylococcus spp. de origen alimentario y su conservación en agua destilada. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, Vol.49, nro. 2. 1 - 6 p.
- World Data Centre for Microorganisms (WDCM). 2002. The Culture Collection in this World: WDCM Statistics [<http://www.wdcm.riken.gov.jp/wfcc.html>].
- World Data Centre for Microorganisms (WDCM). 2015. The Culture Collection in this World: WDCM Statistics [<http://www.wfcc.info/ccinfo/>].
- World Federation for Culture Collection (WFCC), Biodiversity Committee. 1996. Information Document on Access to ex- situ Microbial Genetic Resources within the Framework of the Convention on Biological Diversity. Printed by the Tropical Data Base and made available online by the World Data Centre for Microorganisms [<http://wdcm.nig.ac.jp/wfcc/wfcc.htm>].
- World Federation for Culture Collections (WFCC). 1999. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 2° Edition. WCCF. U.K. [<http://www.wfcc.info>]

- World Federation for Culture Collections (WFCC) Guidelines. 2010. For the establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. 3<sup>o</sup> Edition. [<http://www.wfcc.info>]
- World Federation for Culture Collections (WFCC). 2014. For the establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. [<http://www.wfcc.info>]
- Woese, C. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 87, nro. 12. 4576 - 4579 p.

## ANEXOS

# CRYOBANK

## Conveniente Sistema de Perlas para Almacenar y Reactivar Cultivos de Bacterias

Sistema de fácil manipulación diseñado para almacenar en forma congelada muestras de cepas o cultivos bacterianos con rápida y eficiente recuperación.

- En minutos usted puede congelar y recuperar múltiples subcultivos.
- La recuperación de cepas bacterias es muy simple y le ofrece la posibilidad de obtener un cultivo nuevo cada vez que sea necesario, eliminando la variación que a veces es común en la multiplicación repetida de subcultivos.
- Una manera económica de mantener eficientes controles ATCC y cultivos de referencia.
- Proporciona un ahorro significativo cuando comparado con cultivos comerciales liofilizados.
- Su presentación en pequeñas cajas para uso en el congelador con diagramas de grades impresos facilitan el almacenamiento, la identificación y localización de las cepas.



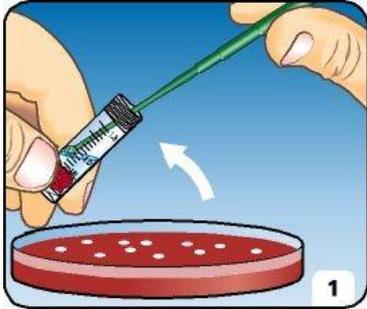
### CRYOBANK™ Es Conveniente

CRYOBANK™ se basa en un sistema de un criovial que contiene perlas químicamente tratadas suspendidas en una solución preservante criogénica especial.

CRYOBANK™ le ofrece un sistema confiable, conveniente y versátil para guardar y preservar bacterias fastidiosas por periodos prolongados. CRYOBANK™ es más económico que la liofilización, la obtención repetitiva de subculturas o la compra de microorganismos de control. CRYOBANK™ permite el fácil establecimiento de banco de cepas para acreditación de laboratorios o propósitos de investigación. Es un sistema de fácil manipulación que puede ser implementado en cualquier laboratorio de microbiología incluyendo:

- Clínica
- Cervecería
- Alimentos
- Biotecnología
- Agua
- Veterinaria
- Farmacéutica

## MODO DE USO



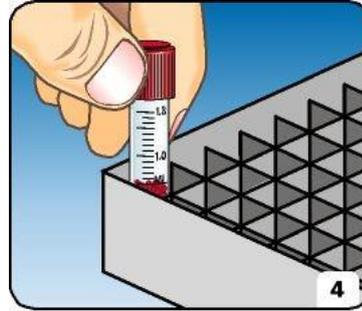
De una placa que contenga un cultivo fresco (de no más de 18 horas), retire una muestra concentrada y disuélvala en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK™.



Agite hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, esto permitirá que las bacterias se adhieran a las perlas.

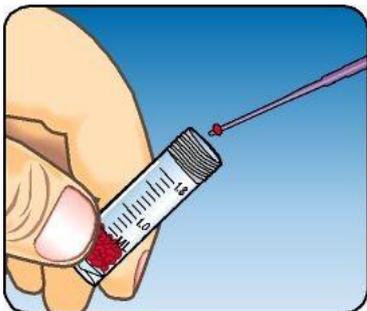


Con una pipeta estéril remueva del tubo el medio de cultivo de CRYOBANK™.

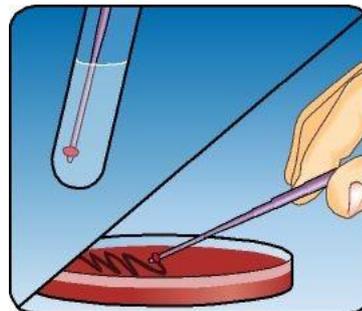


Inmediatamente después almacene el tubo de CRYOBANK™ a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido.

## RECUPERACIÓN (Activación)



Remueva el tubo de CRYOBANK™ del congelador o contenedor de nitrógeno líquido. Remueva la tapa del tubo de CRYOBANK™. Remueva una perla usando pinza o una alsa de aguja para inoculación.



Pase la perla sobre la superficie de una placa que contenga un medio de cultivo apropiado o deposítela en un caldo nutriente.

De inmediato regrese el tubo de CRYOBANK™ con las perlas sobrantes al congelador o contenedor de nitrógeno líquido para prevenir que se descongelen.

## ANEXO: ESCALA DE TURBIDEZ MCFARLAND

Los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para estimar el número de UFC bacteriana por mililitro según una escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1 % con ácido sulfúrico al 1 % en volúmenes específicos. Los estándares pueden ser visualmente comparados y suele usarse cuando se necesita conocer el número de bacterias pero no se cuenta con un equipamiento especial, tal como un espectrofotómetro; la desventaja de este método es que no es exacto y no discrimina a las bacterias vivas de las muertas, pero en el sentido que se ha usado a partir de un cultivo activo, nos orienta en estimar el orden bacteriano que estamos sembrando. En la práctica utilizamos el nivel 0,5 y 1 de la escala McFarland que corresponden a  $1,5 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  UFC/mL.



Imagen: Tubos de McFarland Nivel 0,5; 1 y 1,5

## ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO

- **Agar Baird Parker: (g/L)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Peptona.....              | 10,0 g |
| Extracto de carne.....    | 5,0 g  |
| Extracto de levadura..... | 1,0 g  |
| Piruvato sódico.....      | 10,0 g |
| Glicina.....              | 12,0 g |
| Cloruro de litio.....     | 5,0 g  |
| Agar-agar.....            | 15,0 g |

Esterilizar en autoclave. Enfriar a 50 °C y agregar 50 mL de suspensión de yema de huevo y 3 mL de telurito de potasio al 3,5%. pH 7,0 ± 0,2

- **Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa- Sacarosa (E.M.B): (g/L)**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Peptona.....             | 10,0 g  |
| Lactosa.....             | 10,0 g  |
| Fosfato di-potásico..... | 2,0 g   |
| Eosina.....              | 0,4 g   |
| Azul de metileno.....    | 0,065 g |
| Agar-agar.....           | 14,0 g  |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH: 6,9 ± 0,1.

- **Agar para Recuento en Placa: (g/L)**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Peptona de caseína.....    | 5,0 g  |
| Extracto de levadura ..... | 2,5 g  |
| D (+) glucosa.....         | 1,0 g  |
| Agar-agar.....             | 14,0 g |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH: 6,9 ± 0,1.

- **Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC): (g/L)**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptona.....            | 20,0 g  |
| Sorbitol.....           | 10,0 g  |
| Sales biliares N°3..... | 1,5 g   |
| Cloruro de sodio.....   | 5,0 g   |
| Rojo neutro.....        | 0,03 g  |
| Cristal violeta.....    | 0,001 g |
| Agar- agar.....         | 15,0 g  |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH 7,1 ± 0,2 a 25°C.

- **Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS): (g/L)**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Proteosa peptona N° 3..... | 10.0 g |
| Extracto de carne.....     | 8.0 g  |
| Extracto de levadura.....  | 4.0 g  |
| Glucosa.....               | 20.0 g |
| Monoleato de sorbitán..... | 1 mL   |
| Fosfato dipotásico.....    | 2.0 g  |
| Acetato de sodio.....      | 5.0 g  |
| Citrato de amonio.....     | 2.0 g  |
| Sulfato de magnesio.....   | 0.2 g  |
| Sulfato de manganeso.....  | 0.05 g |
| Agar-agar.....             | 13.0 g |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH final: 6.4 ± 0.2

- **Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) (g/L)**

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Extracto de levadura.....             | 3,0 g  |
| Cloruro de sodio.....                 | 5,0 g  |
| D (+) xilosa.....                     | 3,75 g |
| Lactosa.....                          | 7,5 g  |
| Sacarosa.....                         | 7,5 g  |
| L (+) lisina.....                     | 5,0 g  |
| Desoxicolato sódico.....              | 2,5 g  |
| Tiosulfato de sodio.....              | 6,8 g  |
| Citrato de amonio y hierro (III)..... | 0,8 g  |
| Rojo fenol.....                       | 0,08 g |
| Agar- agar.....                       | 13,0 g |

No esterilizar en autoclave. pH 7,4 ± 0,2.

- **Agua peptonada 1%: (g/L)**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Peptona de carne..... | 10,0 g |
|-----------------------|--------|

Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH: 6,9 ± 0,1.

- **Medio Mossel: (g/L)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Hidrolizado de carne..... | 1,0 g  |
| Peptona de caseína.....   | 10,0 g |

|   |         |
|---|---------|
| D-Mannitol.....   | 10,0 g  |
| Cloruro sódico.....   | 10,0 g  |
| Rojo fenol.....   | 0,025 g |
| Agar-agar.....  | 15,0 g  |
| Esterilizar en autoclave (15 min a 121 ° C) pH final: 7,2 ± 0,2 |         |

## **SOLUCIONES Y COLORANTES**

- **Solución de oxalato de amonio-cristal violeta**

### **Solución A**

|   |       |
|---|-------|
| Cristal violeta (85% de colorante)..... | 2,0 g |
| Alcohol etílico (95%).....              | 20 mL |

### **Solución B**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Oxalato de amonio..... | 0,8 g |
| Agua destilada.....    | 80 mL |

Mezclar A y B.

- **Solución de Lugol**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Iodo.....              | 1,0 g  |
| Ioduro de potasio..... | 2,0 g  |
| Agua destilada.....    | 300 mL |

- **Solución de safranina 0,5%**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Safranina.....      | 0,5 g  |
| Agua destilada..... | 100 mL |

- **Nigrosina 10% (saturada)**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Nigrosina.....      | 10,0 g |
| Agua destilada..... | 100 mL |

**ANEXO: CONTROL DE TEMPERATURA – ESTUFA DE CULTIVO A 28 °C**

| CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA                           |                 |       |             |                   |       |             |
|--|-----------------|-------|-------------|-------------------|-------|-------------|
| CONTROL DE TEMPERATURA - ESTUFA DE CULTIVO A 28 °C |                 |       |             |                   |       |             |
| MES: JUNIO   |                 |       |             | AÑO: 2015         |       |             |
| DÍA  | TEMP (°C) T.MAÑ | HORA  | RESPONSABLE | TEMP (°C) T.TARDE | HORA  | RESPONSABLE |
| 1  | 28,0            | 08:00 | SF          | 28,1              | 14:35 | SF          |
| 2  | 28,0            | 09:00 | CB          | 28,0              | 13:05 | SF          |
| 3  | 28,0            | 09:00 | CB          | 28,0              | 13:00 | SF          |
| 4  | 27,8            | 09:30 | CB          | 28,0              | 14:50 | SF          |
| 5  | 28,1            | 08:05 | SF          | 28,0              | 14:50 | SF          |
| 6  |                 |       |             |                   |       |             |
| 7  |                 |       |             |                   |       |             |
| 8  | 28,2            | 10:25 | CB          | 28,0              | 14:05 | SF          |
| 9  | 28,2            | 08:15 | CB          | 28,0              | 15:00 | SF          |
| 10   | 28,0            | 08:20 | CB          | 28,3              | 15:05 | SF          |
| 11   | 28,0            | 09:45 | CB          | 28,3              | 13:25 | CB          |
| 12   | 28,0            | 09:00 | CB          | 28,0              | 13:30 | CB          |
| 13   |                 |       |             |                   |       |             |
| 14   |                 |       |             |                   |       |             |
| 15   | 27,9            | 09:00 | CB          | 28,0              | 13:10 | SF          |
| 16   | 28,0            | 08:50 | CB          | 28,2              | 14:40 | SF          |
| 17   | 28,0            | 08:00 | SF          | 28,0              | 15:00 | SF          |
| 18   | 28,0            | 08:50 | CB          | 28,0              | 13:30 | CB          |
| 19   | 28,0            | 08:15 | SF          | 28,2              | 13:15 | CB          |
| 20   |                 |       |             |                   |       |             |
| 21   |                 |       |             |                   |       |             |
| 22   | 28,0            | 10:40 | CB          | 27,8              | 13:10 | SF          |
| 23   | 28,0            | 10:00 | CB          | 28,1              | 13:10 | SF          |
| 24   | 28,0            | 09:20 | SF          | 28,0              | 13:00 | SF          |
| 25   | 28,0            | 09:10 | CB          | 28,0              | 13:20 | CB          |
| 26   | 28,0            | 08:30 | SF          | 28,0              | 13:00 | CB          |
| 27   |                 |       |             |                   |       |             |
| 28   |                 |       |             |                   |       |             |
| 29   | 28,0            | 09:00 | CB          | 28,1              | 14:00 | SF          |
| 30   | 28,0            | 09:00 | CB          | 28,2              | 14:00 | SF          |
| 31   |                 |       |             |                   |       |             |

**ANEXO: CONTROL DE TEMPERATURA – ESTUFA DE CULTIVO A 37 °C**

| CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA                           |                 |       |             |                   |       |             |
|--|-----------------|-------|-------------|-------------------|-------|-------------|
| CONTROL DE TEMPERATURA - ESTUFA DE CULTIVO A 37 °C |                 |       |             |                   |       |             |
| MES: JUNIO   |                 |       |             | AÑO: 2015         |       |             |
| DÍA  | TEMP (°C) T.MAÑ | HORA  | RESPONSABLE | TEMP (°C) T.TARDE | HORA  | RESPONSABLE |
| 1  | 37,5            | 09:00 | CB          | 37,0              | 14:00 | SF          |
| 2  | 37,5            | 09:10 | CB          | 37,1              | 13:05 | SF          |
| 3  | 37,0            | 09:00 | SF          | 37,0              | 13:10 | CB          |
| 4  | 37,2            | 10:40 | CB          | 37,0              | 14:00 | SF          |
| 5  | 37,5            | 08:15 | SF          | 37,3              | 13:45 | SF          |
| 6  |                 |       |             |                   |       |             |
| 7  |                 |       |             |                   |       |             |
| 8  | 37,1            | 10:25 | CB          | 37,1              | 13:00 | SF          |
| 9  | 37,1            | 08:20 | SF          | 37,0              | 13:30 | CB          |
| 10   | 37,0            | 08:00 | SF          | 37,0              | 14:25 | SF          |
| 11   | 37,0            | 08:10 | CB          | 37,0              | 13:00 | CB          |
| 12   | 37,1            | 09:00 | CB          | 37,1              | 13:00 | CB          |
| 13   |                 |       |             |                   |       |             |
| 14   |                 |       |             |                   |       |             |
| 15   | 37,5            | 09:15 | CB          | 37,2              | 13:00 | CB          |
| 16   | 37,3            | 09:30 | CB          | 37,1              | 14:40 | SF          |
| 17   | 37,0            | 08:55 | SF          | 37,1              | 13:05 | CB          |
| 18   | 37,0            | 08:50 | CB          | 37,0              | 14:10 | SF          |
| 19   | 37,0            | 08:35 | SF          | 37,0              | 14:00 | SF          |
| 20   |                 |       |             |                   |       |             |
| 21   |                 |       |             |                   |       |             |
| 22   | 37,1            | 10:00 | SF          | 37,1              | 13:10 | SF          |
| 23   | 37,1            | 10:00 | CB          | 37,1              | 14:00 | SF          |
| 24   | 37,1            | 08:10 | SF          | 37,0              | 13:00 | CB          |
| 25   | 37,0            | 09:00 | CB          | 37,0              | 13:25 | CB          |
| 26   | 37,0            | 08:30 | SF          | 37,0              | 13:25 | CB          |
| 27   |                 |       |             |                   |       |             |
| 28   |                 |       |             |                   |       |             |
| 29   | 37,2            | 09:40 | CB          | 37,0              | 14:00 | SF          |
| 30   | 37,5            | 09:00 | SF          | 37,1              | 14:10 | SF          |
| 31   |                 |       |             |                   |       |             |

## ANEXO: SOFTWARE INFOSTAT

### 1. *Escherichia coli*, cepa 2

#### 1.1. Estadística Descriptiva

##### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 7,50  | 0,44 | 0,19     | 5,84  |
| MA          | 1 día    | 3 | 6,99  | 0,08 | 0,01     | 1,10  |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,32  | 0,22 | 0,05     | 3,41  |
| MA          | 90 días  | 3 | 6,09  | 0,10 | 0,01     | 1,61  |
| MA          | 180 días | 3 | 5,43  | 0,14 | 0,02     | 2,58  |
| MA          | 450 días | 3 | 2,10  | 0,17 | 0,03     | 8,27  |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,70  | 0,16 | 0,02     | 2,74  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,51  | 0,42 | 0,18     | 7,67  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 4,63  | 0,11 | 0,01     | 2,47  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,44  | 0,41 | 0,17     | 9,26  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 3,64  | 0,06 | 3,4E-03  | 1,59  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 2,66  | 0,32 | 0,10     | 11,94 |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo. A los 450 días y para ambos métodos se presentan los menores promedios.

#### 1.2. Estadística Inferencial

##### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,98           | 0,97              | 5,06 |

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM    | F      | p-valor |
|--------------------|-------|----|-------|--------|---------|
| Modelo             | 90,58 | 11 | 8,23  | 124,46 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 15,41 | 1  | 15,41 | 232,89 | <0,0001 |
| Tiempo             | 68,78 | 5  | 13,76 | 207,91 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 6,39  | 5  | 1,28  | 19,32  | <0,0001 |
| Error              | 1,59  | 24 | 0,07  |        |         |
| Total              | 92,17 | 35 |       |        |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p < 0.0001$ ) los niveles de un factor combinados con los del otro producen un efecto sobre la variable respuesta. El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17698

Error: 0,0662 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MCBank      | 4,43   | 18 | 0,06 | A |
| MA          | 5,74   | 18 | 0,06 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45922

Error: 0,0662 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |
|----------|--------|---|------|---|
| 450 días | 2,38   | 6 | 0,11 | A |
| 180 días | 4,53   | 6 | 0,11 | B |
| 60 días  | 5,27   | 6 | 0,11 | C |
| 30 días  | 5,47   | 6 | 0,11 | C |
| 1 día    | 6,25   | 6 | 0,11 | D |
| 0 día    | 6,60   | 6 | 0,11 | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,75726

Error: 0,0662 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |     |
|-------------|----------|--------|---|------|-----|
| MA          | 450 días | 2,10   | 3 | 0,15 | A   |
| MCBank      | 450 días | 2,66   | 3 | 0,15 | A   |
| MCBank      | 180 días | 3,64   | 3 | 0,15 | B   |
| MCBank      | 90 días  | 4,44   | 3 | 0,15 | C   |
| MCBank      | 30 días  | 4,63   | 3 | 0,15 | C   |
| MA          | 180 días | 5,43   | 3 | 0,15 | D   |
| MCBank      | 1 día    | 5,51   | 3 | 0,15 | D   |
| MCBank      | 0 día    | 5,70   | 3 | 0,15 | D E |
| MA          | 90 días  | 6,09   | 3 | 0,15 | D E |
| MA          | 30 días  | 6,32   | 3 | 0,15 | E F |
| MA          | 1 día    | 6,99   | 3 | 0,15 | F G |
| MA          | 0 día    | 7,50   | 3 | 0,15 | G   |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Considerando el último tiempo (450 días) las medias no difieren (son iguales). MCBank en el tiempo 4 (180 días) es diferente a todas las demás. La mayor media se produce en el día 0 (inicial).

## 2. *Escherichia coli*, cepa 26

### 2.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 7,59  | 0,14 | 0,02     | 1,80  |
| MA          | 1 día    | 3 | 7,14  | 0,10 | 0,01     | 1,47  |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,96  | 0,07 | 0,01     | 1,02  |
| MA          | 90 días  | 3 | 6,42  | 0,02 | 3,0E-04  | 0,27  |
| MA          | 180 días | 3 | 3,89  | 0,19 | 0,04     | 4,89  |
| MA          | 450 días | 3 | 3,46  | 0,17 | 0,03     | 5,00  |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,76  | 0,04 | 1,8E-03  | 0,75  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,61  | 0,62 | 0,38     | 10,97 |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 5,37  | 0,25 | 0,06     | 4,56  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,33  | 0,16 | 0,03     | 3,80  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 4,47  | 0,04 | 1,4E-03  | 0,83  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,54  | 0,09 | 0,01     | 2,43  |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo. En el tiempo 5 (450 días) y para ambos métodos, se encuentran los menores promedios.

### 2.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,98           | 0,98              | 4,08 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM    | F      | p-valor |
|--------------------|-------|----|-------|--------|---------|
| Modelo             | 68,80 | 11 | 6,25  | 129,94 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 10,15 | 1  | 10,15 | 210,83 | <0,0001 |
| Tiempo             | 49,46 | 5  | 9,89  | 205,51 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 9,19  | 5  | 1,84  | 38,20  | <0,0001 |
| Error              | 1,16  | 24 | 0,05  |        |         |
| Total              | 69,95 | 35 |       |        |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p < 0.0001$ ) los niveles de un factor combinados con los del otro producen un efecto sobre la variable respuesta para un nivel de significancia de 0,05.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,15094

Error: 0,0481 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MCBank      | 4,85   | 18 | 0,05 | A |
| MA          | 5,91   | 18 | 0,05 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39167

Error: 0,0481 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | 3,50   | 6 | 0,09 | A |   |   |   |
| 180 días | 4,18   | 6 | 0,09 |   | B |   |   |
| 90 días  | 5,38   | 6 | 0,09 |   |   | C |   |
| 30 días  | 6,17   | 6 | 0,09 |   |   |   | D |
| 1 día    | 6,37   | 6 | 0,09 |   |   |   | D |
| 0 día    | 6,67   | 6 | 0,09 |   |   |   | E |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64586

Error: 0,0481 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |   |
|-------------|----------|--------|---|------|---|---|---|---|---|
| MA          | 450 días | 3,46   | 3 | 0,13 | A |   |   |   |   |
| MCBank      | 450 días | 3,54   | 3 | 0,13 | A |   |   |   |   |
| MA          | 180 días | 3,89   | 3 | 0,13 | A | B |   |   |   |
| MCBank      | 90 días  | 4,33   | 3 | 0,13 |   | B |   |   |   |
| MCBank      | 180 días | 4,47   | 3 | 0,13 |   | B |   |   |   |
| MCBank      | 30 días  | 5,37   | 3 | 0,13 |   |   | C |   |   |
| MCBank      | 1 día    | 5,61   | 3 | 0,13 |   |   | C |   |   |
| MCBank      | 0 día    | 5,76   | 3 | 0,13 |   |   | C |   |   |
| MA          | 90 días  | 6,42   | 3 | 0,13 |   |   |   | D |   |
| MA          | 30 días  | 6,96   | 3 | 0,13 |   |   |   | D | E |
| MA          | 1 día    | 7,14   | 3 | 0,13 |   |   |   |   | E |
| MA          | 0 día    | 7,59   | 3 | 0,13 |   |   |   |   | E |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Considerando el último tiempo (450 días) las medias no difieren (son iguales) al igual que a los 180 días del MA. La mayor media se produce en el tiempo 0 (inicial), es lo que se espera cuando se trabaja con organismos vivos.

### 3. *Enterobacter*, cepa 10

#### 3.1. Estadística Descriptiva

##### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 5,80  | 0,07 | 4,4E-03  | 1,14  |
| MA          | 1 día    | 3 | 6,47  | 0,06 | 3,8E-03  | 0,96  |
| MA          | 30 días  | 3 | 5,68  | 0,26 | 0,07     | 4,55  |
| MA          | 90 días  | 3 | 4,42  | 0,71 | 0,51     | 16,13 |
| MA          | 180 días | 3 | 3,78  | 0,36 | 0,13     | 9,44  |
| MA          | 450 días | 3 | 2,00  | 0,00 | 0,00     | 0,00  |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,97  | 0,17 | 0,03     | 2,92  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,93  | 0,20 | 0,04     | 3,39  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 5,72  | 0,03 | 1,2E-03  | 0,61  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,84  | 0,07 | 5,0E-03  | 1,46  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 3,62  | 0,28 | 0,08     | 7,79  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,39  | 0,62 | 0,39     | 18,31 |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo. A los 450 días y para ambos métodos, se encuentran los menores promedios, del mismo modo que en el tiempo 0 (momento inicial) se encuentran los mayores promedios.

#### 3.2. Estadística Inferencial

##### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,96           | 0,94              | 6,73 |

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM    | F      | p-valor |
|--------------------|-------|----|-------|--------|---------|
| Modelo             | 61,35 | 11 | 5,58  | 53,45  | <0,0001 |
| Tiempo             | 57,64 | 5  | 11,53 | 110,49 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,43  | 1  | 0,43  | 4,14   | 0,0530  |
| Tiempo*Tratamiento | 3,27  | 5  | 0,65  | 6,27   | 0,0007  |
| Error              | 2,50  | 24 | 0,10  |        |         |
| Total              | 63,85 | 35 |       |        |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa (p-valor <  $\alpha$ ).  
El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,57667

Error: 0,1043 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | 2,70   | 6 | 0,13 | A |   |   |   |
| 180 días | 3,70   | 6 | 0,13 |   | B |   |   |
| 90 días  | 4,63   | 6 | 0,13 |   |   | C |   |
| 30 días  | 5,70   | 6 | 0,13 |   |   |   | D |
| 0 día    | 5,88   | 6 | 0,13 |   |   |   | D |
| 1 día    | 6,20   | 6 | 0,13 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22224

Error: 0,1043 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 4,69   | 18 | 0,08 | A |
| MCBank      | 4,91   | 18 | 0,08 | A |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,95094

Error: 0,1043 gl: 24

| Tiempo   | Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |     |
|----------|-------------|--------|---|------|---|---|---|---|-----|
| 450 días | MA          | 2,00   | 3 | 0,19 | A |   |   |   |     |
| 450 días | MCBank      | 3,39   | 3 | 0,19 |   | B |   |   |     |
| 180 días | MCBank      | 3,62   | 3 | 0,19 |   | B | C |   |     |
| 180 días | MA          | 3,78   | 3 | 0,19 |   | B | C |   |     |
| 90 días  | MA          | 4,42   | 3 | 0,19 |   |   | C | D |     |
| 90 días  | MCBank      | 4,84   | 3 | 0,19 |   |   |   | D | E   |
| 30 días  | MA          | 5,68   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | E F |
| 30 días  | MCBank      | 5,72   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | E F |
| 0 día    | MA          | 5,80   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | F   |
| 1 día    | MCBank      | 5,93   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | F   |
| 0 día    | MCBank      | 5,97   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | F   |
| 1 día    | MA          | 6,47   | 3 | 0,19 |   |   |   |   | F   |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Considerando los 450 días la media del MA difiere de las demás. A los 90 días las medias son iguales para los dos tratamientos. La mayor media se produce en el tiempo 0 (inicial).

## 4. Bacteria Láctica, cepa C

### 4.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 5,88  | 0,05 | 2,1E-03  | 0,78  |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,26  | 0,14 | 0,02     | 2,59  |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,00  | 0,14 | 0,02     | 2,25  |
| MA          | 90 días  | 3 | 4,42  | 0,20 | 0,04     | 4,44  |
| MA          | 180 días | 3 | 4,60  | 0,06 | 3,7E-03  | 1,33  |
| MA          | 450 días | 3 | 3,08  | 0,69 | 0,48     | 22,53 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,67  | 0,13 | 0,02     | 2,29  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,27  | 0,12 | 0,01     | 2,22  |
| MCbank      | 30 días  | 3 | 5,51  | 0,20 | 0,04     | 3,61  |
| MCBankK     | 90 días  | 3 | 4,94  | 0,02 | 4,5E-04  | 0,43  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 5,11  | 0,12 | 0,01     | 2,39  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,71  | 0,10 | 0,01     | 2,78  |

En el momento inicial (tiempo 0) se observan los mayores promedios. A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo, hasta que a los 450 días y para ambos métodos, se encuentran los menores promedios.

### 4.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,95           | 0,93              | 4,73 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 25,35 | 11 | 2,30 | 42,00 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,24  | 1  | 0,24 | 4,30  | 0,0490  |
| Tiempo             | 23,51 | 5  | 4,70 | 85,70 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 1,60  | 5  | 0,32 | 5,85  | 0,0011  |
| Error              | 1,32  | 24 | 0,05 |       |         |
| Total              | 26,67 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa (p-valor <  $\alpha = 0,05$ ), los niveles de cada factor producen un efecto distinto sobre la variable respuesta.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16117

Error: 0,0549 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 4,87   | 18 | 0,06 | A |
| MCBank      | 5,04   | 18 | 0,06 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,41820

Error: 0,0549 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | 3,40   | 6 | 0,10 | A |   |   |   |
| 90 días  | 4,68   | 6 | 0,10 |   | B |   |   |
| 180 días | 4,85   | 6 | 0,10 |   | B | C |   |
| 1 día    | 5,27   | 6 | 0,10 |   |   | C |   |
| 30 días  | 5,75   | 6 | 0,10 |   |   |   | D |
| 0 día    | 5,77   | 6 | 0,10 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,68961

Error: 0,0549 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|----------|--------|---|------|---|---|---|---|---|---|---|
| MA          | 450 días | 3,08   | 3 | 0,14 | A |   |   |   |   |   |   |
| MCBank      | 450 días | 3,71   | 3 | 0,14 | A |   |   |   |   |   |   |
| MA          | 90 días  | 4,42   | 3 | 0,14 |   | B |   |   |   |   |   |
| MA          | 180 días | 4,60   | 3 | 0,14 |   | B | C |   |   |   |   |
| MCBank      | 90 días  | 4,94   | 3 | 0,14 |   | B | C | D |   |   |   |
| MCBank      | 180 días | 5,11   | 3 | 0,14 |   | B | C | D | E |   |   |
| MA          | 1 día    | 5,26   | 3 | 0,14 |   |   | C | D | E | F |   |
| MCBank      | 1 día    | 5,27   | 3 | 0,14 |   |   | C | D | E | F |   |
| MCBank      | 30 días  | 5,51   | 3 | 0,14 |   |   |   | D | E | F | G |
| MCBank      | 0 día    | 5,67   | 3 | 0,14 |   |   |   |   | E | F | G |
| MA          | 0 día    | 5,88   | 3 | 0,14 |   |   |   |   |   | F | G |
| MA          | 30 días  | 6,00   | 3 | 0,14 |   |   |   |   |   |   | G |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Considerando el último tiempo (450 días) las medias no difieren (son iguales) para ambos métodos.

## 5. Bacteria Láctica, cepa K

### 5.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 5,63  | 0,27 | 0,07     | 4,82  |
| MA          | 1 día    | 3 | 6,49  | 0,25 | 0,06     | 3,90  |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,71  | 0,14 | 0,02     | 2,14  |
| MA          | 90 días  | 3 | 6,61  | 0,08 | 0,01     | 1,14  |
| MA          | 180 días | 3 | 6,48  | 0,06 | 3,5E-03  | 0,91  |
| MA          | 450 días | 3 | 5,86  | 0,60 | 0,36     | 10,29 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,75  | 0,19 | 0,04     | 3,36  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 6,52  | 0,22 | 0,05     | 3,37  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 6,10  | 0,27 | 0,07     | 4,40  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 6,48  | 0,13 | 0,02     | 1,94  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 6,44  | 0,02 | 3,2E-04  | 0,28  |
| MCBank      | 459 días | 3 | 5,97  | 0,26 | 0,07     | 4,30  |

En los dos métodos, al momento inicial (día 0) se encuentran promedios menores que en el día 1. En el MA el promedio del tiempo 0 es menor que a los 450 días.

### 5.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|----|
| Log.rec  | 36 | 0,74           | 0,634             | 05 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC   | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 4,49 | 11 | 0,41 | 6,37  | 0,0001  |
| Tratamiento        | 0,06 | 1  | 0,06 | 1,01  | 0,3251  |
| Tiempo             | 3,87 | 5  | 0,77 | 12,07 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 0,56 | 5  | 0,11 | 1,73  | 0,1652  |
| Error              | 1,54 | 24 | 0,06 |       |         |
| Total              | 6,03 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo no es significativa, los niveles de cada factor producen un efecto distinto sobre la variable respuesta. El factor tiempo es significativo pero el factor tratamiento no lo es.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17426

Error: 0,0642 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MCBank      | 6,21   | 18 | 0,06 | A |
| MA          | 6,30   | 18 | 0,06 | A |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45218

Error: 0,0642 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |
|----------|--------|---|------|---|
| 0 día    | 5,69   | 6 | 0,10 | A |
| 450 días | 5,91   | 6 | 0,10 | A |
| 30 días  | 6,40   | 6 | 0,10 | B |
| 180 días | 6,46   | 6 | 0,10 | B |
| 1 día    | 6,50   | 6 | 0,10 | B |
| 90 días  | 6,55   | 6 | 0,10 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,74565

Error: 0,0642 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|-------------|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| MA          | 0 día    | 5,63   | 3 | 0,15 | A |   |   |   |
| MCBank      | 0 día    | 5,75   | 3 | 0,15 | A | B |   |   |
| MA          | 450 días | 5,86   | 3 | 0,15 | A | B | C |   |
| MCBank      | 450 días | 5,97   | 3 | 0,15 | A | B | C | D |
| MCBank      | 30 días  | 6,10   | 3 | 0,15 | A | B | C | D |
| MCBank      | 180 días | 6,44   | 3 | 0,15 |   | B | C | D |
| MA          | 180 días | 6,48   | 3 | 0,15 |   | B | C | D |
| MCBank      | 90 días  | 6,48   | 3 | 0,15 |   | B | C | D |
| MA          | 1 día    | 6,49   | 3 | 0,15 |   | B | C | D |
| MCBank      | 1 día    | 6,52   | 3 | 0,15 |   |   | C | D |
| MA          | 90 días  | 6,61   | 3 | 0,15 |   |   |   | D |
| MA          | 30 días  | 6,71   | 3 | 0,15 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Las medias no difieren (son iguales) para ambos métodos a los 0 y 450 días y en el caso del MCBank también coincide a los 30 días.

## 6. Bacteria Láctica, cepa L

### 6.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV   |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|------|
| MA          | 0 día    | 3 | 6,15  | 0,14 | 0,02     | 2,35 |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,34  | 0,07 | 4,5E-03  | 1,26 |
| MA          | 30 días  | 3 | 5,77  | 0,13 | 0,02     | 2,30 |
| MA          | 90 días  | 3 | 5,60  | 0,30 | 0,09     | 5,37 |
| MA          | 180 días | 3 | 5,32  | 0,21 | 0,04     | 3,97 |
| MA          | 450 días | 3 | 4,12  | 0,26 | 0,07     | 6,30 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 6,01  | 0,18 | 0,03     | 2,96 |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,41  | 0,07 | 4,8E-03  | 1,28 |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 5,83  | 0,13 | 0,02     | 2,16 |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 6,00  | 0,35 | 0,12     | 5,88 |
| MCBank      | 180 días | 3 | 5,15  | 0,15 | 0,02     | 2,90 |
| MCBank      | 450 días | 3 | 5,54  | 0,19 | 0,03     | 3,35 |

Al día cero para ambos métodos se observan los mayores promedios. En el MA a los 450 días se observa el menor promedio, mientras que en el MCBank se encuentra a los 180 días.

### 6.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,91           | 0,87              | 3,62 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 9,64  | 11 | 0,88 | 21,96 | <0,0001 |
| Tiempo             | 6,30  | 5  | 1,26 | 31,56 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,67  | 1  | 0,67 | 16,90 | 0,0004  |
| Tiempo*Tratamiento | 2,67  | 5  | 0,53 | 13,38 | <0,0001 |
| Error              | 0,96  | 24 | 0,04 |       |         |
| Total              | 10,60 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p < 0.0001$ ) los niveles de un factor combinados con los del otro producen un efecto sobre la variable respuesta. El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,35669

Error: 0,0399 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|
| 450 días | 4,83   | 6 | 0,08 | A |   |
| 180 días | 5,24   | 6 | 0,08 |   | B |
| 1 día    | 5,38   | 6 | 0,08 |   | B |
| 30 días  | 5,80   | 6 | 0,08 |   | C |
| 90 días  | 5,80   | 6 | 0,08 |   | C |
| 0 día    | 6,08   | 6 | 0,08 |   | C |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13746

Error: 0,0399 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 5,38   | 18 | 0,05 | A |
| MCBank      | 5,66   | 18 | 0,05 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,58818

Error: 0,0399 gl: 24

| Tiempo   | Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |   |
|----------|-------------|--------|---|------|---|---|---|---|---|
| 450 días | MA          | 4,12   | 3 | 0,12 | A |   |   |   |   |
| 180 días | MCBank      | 5,15   | 3 | 0,12 |   | B |   |   |   |
| 180 días | MA          | 5,32   | 3 | 0,12 |   | B | C |   |   |
| 1 día    | MA          | 5,34   | 3 | 0,12 |   | B | C |   |   |
| 1 día    | MCBank      | 5,41   | 3 | 0,12 |   | B | C | D |   |
| 450 días | MCBank      | 5,54   | 3 | 0,12 |   | B | C | D | E |
| 90 días  | MA          | 5,60   | 3 | 0,12 |   | B | C | D | E |
| 30 días  | MA          | 5,77   | 3 | 0,12 |   |   | C | D | E |
| 30 días  | MCBank      | 5,83   | 3 | 0,12 |   |   | C | D | E |
| 90 días  | MCBank      | 6,00   | 3 | 0,12 |   |   |   | D | E |
| 0 día    | MCBank      | 6,01   | 3 | 0,12 |   |   |   |   | E |
| 0 día    | MA          | 6,15   | 3 | 0,12 |   |   |   |   | F |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

A los 450 días la media del MA es diferente a todas las demás.

## 7. *Listeria monocytogenes*, cepa 3

### 7.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV   |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|------|
| MA          | 0 día    | 3 | 7,35  | 0,63 | 0,40     | 8,64 |
| MA          | 1 día    | 3 | 6,89  | 0,06 | 4,2E-03  | 0,94 |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,31  | 0,24 | 0,06     | 3,80 |
| MA          | 90 días  | 3 | 6,02  | 0,37 | 0,13     | 6,10 |
| MA          | 180 días | 3 | 6,59  | 0,14 | 0,02     | 2,16 |
| MA          | 450 días | 3 | 5,54  | 0,41 | 0,17     | 7,41 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 7,53  | 0,16 | 0,03     | 2,18 |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 6,94  | 0,09 | 0,01     | 1,34 |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 6,82  | 0,09 | 0,01     | 1,38 |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 6,62  | 0,17 | 0,03     | 2,64 |
| MCBank      | 180 días | 3 | 6,66  | 0,08 | 0,01     | 1,15 |
| MCBank      | 450 días | 3 | 6,38  | 0,01 | 1,2E-04  | 0,17 |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo hasta los 90 días, a los 180 días aumenta y a los 450 días se encuentran los menores promedios para ambos métodos.

### 7.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,85           | 0,78              | 4,06 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 9,79  | 11 | 0,89 | 12,28 | <0,0001 |
| Tiempo             | 7,75  | 5  | 1,55 | 21,39 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 1,27  | 1  | 1,27 | 17,57 | 0,0003  |
| Tiempo*Tratamiento | 0,77  | 5  | 0,15 | 2,12  | 0,0977  |
| Error              | 1,74  | 24 | 0,07 |       |         |
| Total              | 11,53 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo no es significativa ( $p=0.0977$ ). Se estudian efectos principales, o sea, tratamiento y tiempo, donde los valores de  $p$  son menores a 0,05. El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48049

Error: 0,0724 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|
| 450 días | 5,96   | 6 | 0,11 | A |   |   |
| 180 días | 6,32   | 6 | 0,11 | A | B |   |
| 90 días  | 6,56   | 6 | 0,11 |   | B | C |
| 180 días | 6,63   | 6 | 0,11 |   | B | C |
| 1 día    | 6,91   | 6 | 0,11 |   |   | C |
| 0 día    | 7,44   | 6 | 0,11 |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18517

Error: 0,0724 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 6,45   | 18 | 0,06 | A |
| MCBank      | 6,82   | 18 | 0,06 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,79233

Error: 0,0724 gl: 24

| Tiempo   | Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|-------------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | MA          | 5,54   | 3 | 0,16 | A |   |   |   |
| 90 días  | MA          | 6,02   | 3 | 0,16 | A | B |   |   |
| 30 días  | MA          | 6,31   | 3 | 0,16 | A | B | C |   |
| 450 días | MCBank      | 6,38   | 3 | 0,16 |   | B | C |   |
| 180 días | MA          | 6,59   | 3 | 0,16 |   | B | C | D |
| 90 días  | MCBank      | 6,62   | 3 | 0,16 |   | B | C | D |
| 180 días | MCBank      | 6,66   | 3 | 0,16 |   | B | C | D |
| 30 días  | MCBank      | 6,82   | 3 | 0,16 |   |   | C | E |
| 1 día    | MA          | 6,89   | 3 | 0,16 |   |   | C | D |
| 1 día    | MCBank      | 6,94   | 3 | 0,16 |   |   | C | D |
| 0 día    | MA          | 7,35   | 3 | 0,16 |   |   |   | D |
| 0 día    | MCBank      | 7,53   | 3 | 0,16 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

La mayor media se produce en el tiempo inicial (0 día) para ambos métodos, es lo que se espera cuando se trabaja con organismos vivos.

## 8. *Salmonella*, cepa 11

### 8.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 5,23  | 0,05 | 2,7E-03  | 0,99  |
| MA          | 1 día    | 3 | 4,82  | 0,37 | 0,13     | 7,58  |
| MA          | 30 días  | 3 | 4,49  | 0,12 | 0,01     | 2,69  |
| MA          | 90 días  | 3 | 3,78  | 0,11 | 0,01     | 2,95  |
| MA          | 180 días | 3 | 2,90  | 0,05 | 2,4E-03  | 1,67  |
| MA          | 450 días | 3 | 2,39  | 0,36 | 0,13     | 14,93 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,04  | 0,04 | 1,4E-03  | 0,74  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 4,79  | 0,28 | 0,08     | 5,80  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 4,72  | 0,25 | 0,06     | 5,31  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,58  | 0,13 | 0,02     | 2,89  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 3,83  | 0,04 | 1,7E-03  | 1,09  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,63  | 0,13 | 0,02     | 3,69  |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo. A los 450 días y para ambos métodos, se encuentran los menores promedios.

### 8.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,96           | 0,95              | 4,74 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F      | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|--------|---------|
| Modelo             | 25,77 | 11 | 2,34 | 59,57  | <0,0001 |
| Tratamiento        | 2,23  | 1  | 2,23 | 56,64  | <0,0001 |
| Tiempo             | 21,08 | 5  | 4,22 | 107,20 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 2,46  | 5  | 0,49 | 12,52  | <0,0001 |
| Error              | 0,94  | 24 | 0,04 |        |         |
| Total              | 26,71 |    |      |        |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p < 0.0001$ ) los niveles de un factor combinados con los del otro producen un efecto sobre la variable respuesta. El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13643

Error: 0,0393 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 3,94   | 18 | 0,05 | A |
| MCBank      | 4,43   | 18 | 0,05 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,35402

Error: 0,0393 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | 3,01   | 6 | 0,08 | A |   |   |   |
| 180 días | 3,37   | 6 | 0,08 |   | B |   |   |
| 90 días  | 4,18   | 6 | 0,08 |   |   | C |   |
| 30 días  | 4,60   | 6 | 0,08 |   |   |   | D |
| 1 día    | 4,81   | 6 | 0,08 |   |   |   | D |
| 0 día    | 5,14   | 6 | 0,08 |   |   |   | E |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,58378

Error: 0,0393 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|-------------|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| MA          | 450 días | 2,39   | 3 | 0,11 | A |   |   |   |
| MA          | 180 días | 2,90   | 3 | 0,11 | A |   |   |   |
| MCBank      | 450 días | 3,63   | 3 | 0,11 |   | B |   |   |
| MA          | 90 días  | 3,78   | 3 | 0,11 |   | B |   |   |
| MCBank      | 180 días | 3,83   | 3 | 0,11 |   | B |   |   |
| MA          | 30 días  | 4,49   | 3 | 0,11 |   |   | C |   |
| MCBank      | 90 días  | 4,58   | 3 | 0,11 |   |   | C |   |
| MCBank      | 30 días  | 4,72   | 3 | 0,11 |   |   | C | D |
| MCBank      | 1 día    | 4,79   | 3 | 0,11 |   |   | C | D |
| MA          | 1 día    | 4,82   | 3 | 0,11 |   |   | C | D |
| MCBank      | 0 día    | 5,04   | 3 | 0,11 |   |   | C | D |
| MA          | 0 día    | 5,23   | 3 | 0,11 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Para el MA a los 180 y a los 450 días se observan las menores medias, incluso comparadas con el MCBank a los mismos tiempos. La mayor media se produce en el día cero, para ambos métodos.

## 9. *Salmonella*, cepa 12

### 9.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 4,93  | 0,04 | 1,7E-03  | 0,84  |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,35  | 0,10 | 0,01     | 1,91  |
| MA          | 30 días  | 3 | 5,05  | 0,02 | 6,0E-04  | 0,48  |
| MA          | 90 días  | 3 | 4,75  | 0,63 | 0,40     | 13,28 |
| MA          | 180 días | 3 | 3,60  | 0,19 | 0,04     | 5,39  |
| MA          | 450 días | 3 | 2,39  | 0,36 | 0,13     | 14,93 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 4,87  | 0,07 | 4,7E-03  | 1,41  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 4,91  | 0,19 | 0,03     | 3,80  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 4,28  | 0,11 | 0,01     | 2,68  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,20  | 0,10 | 0,01     | 2,48  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 3,73  | 0,08 | 0,01     | 2,11  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,13  | 0,22 | 0,05     | 7,03  |

Las medias de ambos métodos disminuyen en el tiempo, excepto en el día 1 que para el MA y MCBank superan las medias del día 0.

### 9.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,95           | 0,93              | 5,64 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 26,35 | 11 | 2,40 | 41,41 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,23  | 1  | 0,23 | 3,90  | 0,0599  |
| Tiempo             | 23,86 | 5  | 4,77 | 82,47 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 2,27  | 5  | 0,45 | 7,84  | 0,0002  |
| Error              | 1,39  | 24 | 0,06 |       |         |
| Total              | 27,74 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa (p-valor <  $\alpha=0,05$ ). Los niveles de cada factor combinados producen un efecto sobre la variable respuesta.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16549

Error: 0,0579 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MCBank      | 4,19   | 18 | 0,06 | A |
| MA          | 4,34   | 18 | 0,06 | A |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,42941

Error: 0,0579 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 450 días | 2,76   | 6 | 0,10 | A |   |   |   |
| 180 días | 3,66   | 6 | 0,10 |   | B |   |   |
| 90 días  | 4,47   | 6 | 0,10 |   |   | C |   |
| 30 días  | 4,66   | 6 | 0,10 |   |   | C |   |
| 0 día    | 4,90   | 6 | 0,10 |   |   | C | D |
| 1 día    | 5,13   | 6 | 0,10 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,70810

Error: 0,0579 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |   |   |
|-------------|----------|--------|---|------|---|---|---|---|---|---|
| MA          | 450 días | 2,39   | 3 | 0,14 | A |   |   |   |   |   |
| MCBank      | 450 días | 3,13   | 3 | 0,14 |   | B |   |   |   |   |
| MA          | 180 días | 3,60   | 3 | 0,14 |   | B | C |   |   |   |
| MCBank      | 180 días | 3,73   | 3 | 0,14 |   | B | C |   |   |   |
| MCBank      | 90 días  | 4,20   | 3 | 0,14 |   |   | C | D |   |   |
| MCBank      | 30 días  | 4,28   | 3 | 0,14 |   |   | C | D | E |   |
| MA          | 90 días  | 4,75   | 3 | 0,14 |   |   |   | D | E | F |
| MCBank      | 0 día    | 4,87   | 3 | 0,14 |   |   |   | D | E | F |
| MCBank      | 1 día    | 4,91   | 3 | 0,14 |   |   |   |   | E | F |
| MA          | 0 día    | 4,93   | 3 | 0,14 |   |   |   |   | E | F |
| MA          | 30 días  | 5,05   | 3 | 0,14 |   |   |   |   |   | F |
| MA          | 1 día    | 5,35   | 3 | 0,14 |   |   |   |   |   | F |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

A los 450 días la media del MA es distinta a todas las demás.

## 10. *Escherichia coli*, O157:H7

### 10.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 5,50  | 0,31 | 0,09     | 5,58  |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,29  | 0,23 | 0,05     | 4,33  |
| MA          | 30 días  | 3 | 4,91  | 0,06 | 3,4E-03  | 1,18  |
| MA          | 90 días  | 3 | 3,74  | 0,09 | 0,01     | 2,53  |
| MA          | 180 días | 3 | 2,88  | 0,07 | 4,6E-03  | 2,35  |
| MA          | 450 días | 3 | 2,51  | 0,64 | 0,41     | 25,55 |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 5,16  | 0,74 | 0,55     | 14,38 |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,05  | 0,40 | 0,16     | 7,85  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 4,48  | 0,16 | 0,03     | 3,60  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 4,40  | 0,18 | 0,03     | 4,10  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 3,77  | 0,23 | 0,05     | 6,01  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 3,66  | 0,23 | 0,05     | 6,30  |

A medida que avanzamos en el tiempo, el promedio del log del recuento va disminuyendo. A los 450 días y para ambos métodos, se encuentran los menores promedios.

### 10.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,91           | 0,88              | 8,11 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 31,03 | 11 | 2,82 | 23,43 | <0,0001 |
| Tiempo             | 26,65 | 5  | 5,33 | 44,27 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,70  | 1  | 0,70 | 5,82  | 0,0238  |
| Tiempo*Tratamiento | 3,68  | 5  | 0,74 | 6,11  | 0,0009  |
| Error              | 2,89  | 24 | 0,12 |       |         |
| Total              | 33,92 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p\text{-valor} < \alpha = 0,05$ ), los niveles de cada factor combinados producen un efecto sobre la variable respuesta.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61945

Error: 0,1204 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |     |
|----------|--------|---|------|---|---|-----|
| 450 días | 3,08   | 6 | 0,14 | A |   |     |
| 180 días | 3,33   | 6 | 0,14 | A |   |     |
| 90 días  | 4,07   | 6 | 0,14 |   | B |     |
| 30 días  | 4,70   | 6 | 0,14 |   |   | C   |
| 1 día    | 5,17   | 6 | 0,14 |   |   | C D |
| 0 día    | 5,33   | 6 | 0,14 |   |   | D   |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23873

Error: 0,1204 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 4,14   | 18 | 0,08 | A |
| MCBank      | 4,42   | 18 | 0,08 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,02148

Error: 0,1204 gl: 24

| Tiempo   | Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |   |   |     |
|----------|-------------|--------|---|------|---|---|---|-----|
| 450 días | MA          | 2,51   | 3 | 0,20 | A |   |   |     |
| 180 días | MA          | 2,88   | 3 | 0,20 | A | B |   |     |
| 450 días | MCBank      | 3,66   | 3 | 0,20 |   | B | C |     |
| 90 días  | MA          | 3,74   | 3 | 0,20 |   | B | C |     |
| 180 días | MCBank      | 3,77   | 3 | 0,20 |   | B | C |     |
| 90 días  | MCBank      | 4,40   | 3 | 0,20 |   |   | C | D   |
| 30 días  | MCBank      | 4,48   | 3 | 0,20 |   |   | C | D   |
| 30 días  | MA          | 4,91   | 3 | 0,20 |   |   |   | D E |
| 1 día    | MCBank      | 5,05   | 3 | 0,20 |   |   |   | D E |
| 0 día    | MCBank      | 5,16   | 3 | 0,20 |   |   |   | D E |
| 1 día    | MA          | 5,29   | 3 | 0,20 |   |   |   | D E |
| 0 día    | MA          | 5,50   | 3 | 0,20 |   |   |   | E   |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

A los 180 y 450 días para el MA las medias son iguales. Las menores medias se observan a los 450 días para ambos métodos.

## 11. *Bacillus subtilis*

### 11.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 7,51  | 0,05 | 2,1E-03  | 0,61  |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,60  | 0,21 | 0,05     | 3,79  |
| MA          | 30 días  | 3 | 6,03  | 0,90 | 0,81     | 14,93 |
| MA          | 90 días  | 3 | 5,64  | 0,18 | 0,03     | 3,20  |
| MA          | 180 días | 3 | 4,46  | 0,15 | 0,02     | 3,39  |
| MA          | 450 días | 3 | 6,19  | 0,09 | 0,01     | 1,46  |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 6,69  | 0,18 | 0,03     | 2,74  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 5,54  | 0,47 | 0,22     | 8,48  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 5,90  | 0,39 | 0,15     | 6,54  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 5,91  | 0,05 | 2,8E-03  | 0,90  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 4,69  | 0,21 | 0,05     | 4,54  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 4,67  | 0,07 | 0,01     | 1,58  |

La menor media para el MA se observa a los 180 días y para el MCBank a los 450 días. Para ambos métodos la mayor media se encuentra al día cero.

### 11.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,90           | 0,86              | 5,91 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 24,99 | 11 | 2,27 | 19,77 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 1,03  | 1  | 1,03 | 8,93  | 0,0064  |
| Tiempo             | 20,28 | 5  | 4,06 | 35,28 | <0,0001 |
| Tratamiento*Tiempo | 3,69  | 5  | 0,74 | 6,42  | 0,0006  |
| Error              | 2,76  | 24 | 0,11 |       |         |
| Total              | 27,75 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa ( $p\text{-valor} < \alpha = 0,05$ ), los niveles de cada factor combinados producen un efecto sobre la variable respuesta.

El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23325

Error: 0,1149 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MCBank      | 5,57   | 18 | 0,08 | A |
| MA          | 5,91   | 18 | 0,08 | B |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60525

Error: 0,1149 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |
|----------|--------|---|------|---|
| 180 días | 4,58   | 6 | 0,14 | A |
| 450 días | 5,43   | 6 | 0,14 | B |
| 1 día    | 5,57   | 6 | 0,14 | B |
| 90 días  | 5,77   | 6 | 0,14 | B |
| 30 días  | 5,97   | 6 | 0,14 | B |
| 0 día    | 7,10   | 6 | 0,14 | C |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,99805

Error: 0,1149 gl: 24

| Tratamiento | Tiempo   | Medias | n | E.E. |     |
|-------------|----------|--------|---|------|-----|
| MA          | 180 días | 4,46   | 3 | 0,20 | A   |
| MCBank      | 450 días | 4,67   | 3 | 0,20 | A B |
| MCBank      | 180 días | 4,69   | 3 | 0,20 | A B |
| MCBank      | 1 día    | 5,54   | 3 | 0,20 | B C |
| MA          | 1 día    | 5,60   | 3 | 0,20 | B C |
| MA          | 90 días  | 5,64   | 3 | 0,20 | B C |
| MCBank      | 30 días  | 5,90   | 3 | 0,20 | C D |
| MCBank      | 90 días  | 5,91   | 3 | 0,20 | C D |
| MA          | 30 días  | 6,03   | 3 | 0,20 | C D |
| MA          | 450 días | 6,19   | 3 | 0,20 | C D |
| MCBank      | 0 día    | 6,69   | 3 | 0,20 | D E |
| MA          | 0 día    | 7,51   | 3 | 0,20 | E   |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

La media para los 180 días de ambos métodos es la misma y también es la misma para los 450 días del MCBank. Se observa que para el MA Y MCBank las medias son las mismas al tiempo inicial (0 día).

## 12. *Staphylococcus aureus*

### 12.1. Estadística Descriptiva

#### Medidas resumen de tratamientos combinados

MA: Método Alternativo

MCBank: Método CRYOBANK

| Tratamiento | Tiempo   | n | Media | D.E. | Var(n-1) | CV    |
|-------------|----------|---|-------|------|----------|-------|
| MA          | 0 día    | 3 | 6,90  | 0,87 | 0,76     | 12,63 |
| MA          | 1 día    | 3 | 5,34  | 0,18 | 0,03     | 3,38  |
| MA          | 30 días  | 3 | 7,33  | 0,22 | 0,05     | 3,05  |
| MA          | 90 días  | 3 | 7,24  | 0,42 | 0,18     | 5,80  |
| MA          | 180 días | 3 | 6,26  | 0,08 | 0,01     | 1,33  |
| MA          | 450 días | 3 | 4,70  | 0,10 | 0,01     | 2,03  |
| MCBank      | 0 día    | 3 | 7,39  | 0,01 | 1,4E-04  | 0,16  |
| MCBank      | 1 día    | 3 | 4,69  | 0,36 | 0,13     | 7,61  |
| MCBank      | 30 días  | 3 | 6,94  | 0,05 | 2,5E-03  | 0,71  |
| MCBank      | 90 días  | 3 | 6,71  | 0,30 | 0,09     | 4,50  |
| MCBank      | 180 días | 3 | 6,77  | 0,15 | 0,02     | 2,21  |
| MCBank      | 450 días | 3 | 6,18  | 0,20 | 0,04     | 3,31  |

A los 30 días se observa el mayor promedio para el MA y en el día 0 para el MCBank.

### 12.2. Estadística Inferencial

#### Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Log.rec  | 36 | 0,92           | 0,89              | 5,20 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.               | SC    | gl | CM   | F     | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo             | 30,97 | 11 | 2,82 | 25,60 | <0,0001 |
| Tiempo             | 25,65 | 5  | 5,13 | 46,65 | <0,0001 |
| Tratamiento        | 0,22  | 1  | 0,22 | 1,98  | 0,1723  |
| Tiempo*Tratamiento | 5,10  | 5  | 1,02 | 9,27  | 0,0001  |
| Error              | 2,64  | 24 | 0,11 |       |         |
| Total              | 33,61 | 35 |      |       |         |

La interacción del tratamiento por tiempo es significativa (p-valor <  $\alpha$ ).  
El análisis después del Análisis de la Varianza (ADEVA) es un test de Tukey.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59201

Error: 0,1100 gl: 24

| Tiempo   | Medias | n | E.E. |   |   |   |
|----------|--------|---|------|---|---|---|
| 1 día    | 5,01   | 6 | 0,14 | A |   |   |
| 450 días | 5,44   | 6 | 0,14 | A |   |   |
| 180 días | 6,52   | 6 | 0,14 |   | B |   |
| 90 días  | 6,97   | 6 | 0,14 |   | B | C |
| 30 días  | 7,14   | 6 | 0,14 |   |   | C |
| 0 día    | 7,15   | 6 | 0,14 |   |   | C |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22815

Error: 0,1100 gl: 24

| Tratamiento | Medias | n  | E.E. |   |
|-------------|--------|----|------|---|
| MA          | 6,29   | 18 | 0,08 | A |
| MCBank      | 6,45   | 18 | 0,08 | A |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,97623

Error: 0,1100 gl: 24

| Tiempo   | Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |   |   |   |
|----------|-------------|--------|---|------|---|---|---|---|
| 1 día    | MCBank      | 4,69   | 3 | 0,19 | A |   |   |   |
| 450 días | MA          | 4,70   | 3 | 0,19 | A |   |   |   |
| 1 día    | MA          | 5,34   | 3 | 0,19 | A | B |   |   |
| 450 días | MCBank      | 6,18   | 3 | 0,19 |   | B | C |   |
| 180 días | MA          | 6,26   | 3 | 0,19 |   | B | C |   |
| 90 días  | MCBank      | 6,71   | 3 | 0,19 |   |   | C | D |
| 180 días | MCBank      | 6,77   | 3 | 0,19 |   |   | C | D |
| 0 día    | MA          | 6,90   | 3 | 0,19 |   |   | C | D |
| 30 días  | MCBank      | 6,94   | 3 | 0,19 |   |   | C | D |
| 90 días  | MA          | 7,24   | 3 | 0,19 |   |   |   | D |
| 30 días  | MA          | 7,33   | 3 | 0,19 |   |   |   | D |
| 0 día    | MCBank      | 7,39   | 3 | 0,19 |   |   |   | D |

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

La media del día 1 del MCBank y la de los 450 días del MA son iguales.