

**EVALUACION DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli*  
ATCC 25922, Y ESTANDARIZACION DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE  
PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO EMPLEANDO BUFFER FOSFATOS.**



**ASTRID XIOMARA GARZON RUIZ  
JULIETH ANDREA GOMEZ GUERRERO**

**DIRECTOR  
SAUL ANTONIO PEÑARANDA**

**ASESORA  
IVONNE GUITIERREZ ROJAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C  
NOVIEMBRE 2007**

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA *Escheria coli* ATCC 25922, Y ESTANDARIZACION DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO EMPLEANDO BUFFER FOSFATOS.**

**ASTRID XIOMARA GARZON RUIZ  
JULIETH ANDREA GOMEZ GUERRERO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar al titulo de**

**MICROBIOLOGAS INDUSTRIALES**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
BOGOTÁ D.C.  
NOVIEMBRE DE 2007**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli*  
ATCC 25922, Y ESTANDARIZACION DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE  
PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO EMPLEANDO BUFFER FOSFATOS.**

**ASTRID XIOMARA GARZON RUIZ  
JULIETH ANDREA GOMEZ GUERRERO**

**APROBADO**

---

Dra. ANGELA UMANA MUÑOZ MPhil.

Decana Académica

Facultad de Ciencias

---

Dra. JANETH ARIAS PALACIOS MSc.

Directora de Carrera

Microbiología Industrial

A mis padres por el apoyo incondicional durante toda mi carrera, a mis hermanas por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles, y a las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo.

*Astrid Xiomara*

A Dios por lo que es y significa en mi vida, a mis padres por sus sabios consejos y amor incondicional y a mis hermanos por estar conmigo en los momentos más difíciles.

*Juliech Andrea*

## **RESUMEN**

Este trabajo se llevo a cabo en el instituto Nacional de Salud (INS), utilizando un fermentador New Brunswick en operación discontinua, para establecer la fase en la cual hay mayor cantidad de células para iniciar el proceso de conservación. Se realizo un método alternativo de conservación a corto plazo diferente a la solución salina que es utilizado en el INS para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, empleando buffer fosfatos con pH de 7.2 -7.8 y 8.3, sometiéndolos a diferentes temperaturas (37°C, Refrigeración, ambiente) durante 20 días para evaluar la viabilidad y estabilidad del microorganismo. Observando que en todas las soluciones se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la viabilidad del microorganismo, y que el Buffer 8.3 mantiene mejor la estabilidad en las tres temperaturas, posiblemente por que al producirse cambios en la concentración de sales, la composición lipídica de la membrana celular frente a una nueva situación de estrés osmótico genera modificaciones en el tipo de fosfolípidos aportando consistencia a la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura.

Por otro lado, se ha reportado que *E. coli* es capaz de responder a los cambios de ambiente alcalino, además de estrategias de resistencia que incluyen el incremento en la producción de ácidos a través de acido amino diaminasas y fermentación de azucares, cambios en las propiedades de la superficie celular e incremento de la expresión y actividad de antiportes catión/protón.

Aunque estos dos mecanismos de respuesta de *E. coli*, frente a estrés osmótico y pH alcalinos, han sido reportados en cultivos, es decir cuando la bacteria está metabólicamente activa, podría inferirse de acuerdo a las condiciones de

crecimiento de la bacteria que esta puede encontrarse más o menos adaptada para sobrevivir a estas condiciones. Sin embargo, no hay suficiente información, ni en este ni en otros estudios, para comprobar dicha afirmación, es necesario adelantar investigaciones tendientes a dilucidar los mecanismos por los cuales *E. coli* es capaz de sobrevivir en estos ambientes aun cuando aparentemente no está metabólicamente activa.

**Palabras clave: Buffer, Conservación, Estabilidad, Fermentación, Viabilidad.**

**ABSTRACT**

This work I am carried out in the National institute of health (INS), using a reactor New Brunswick in discontinuous operation, to establish the phase in which there is greater amount of cells to initiate the conservation process. I am made an alternative method of conservation in the short term different from the saline solution that is used in the INS for the stock *Escherichia coli* ATCC 25922, using buffer phosphates with pH of 7,2 7,8 - and 8,3 and putting under them different temperatures (37°C, Refrigeration, atmosphere) during 20 days to evaluate the viability and stability of the microorganism. Observing which in all the solutions they demonstrated good results as in the viability of the microorganism and that Buffer 8,3 maintains better the stability in the three temperatures, possibly so that when taking place changes in the concentration of salts, the lipídic composition of the cellular membrane front to a new situation of osmotic stress generates modifications in the type of phospholipids contributing consistency to the membrane, that are necessary to maintain the structure.

Moreover, it has been reported that *E. Coli* is capable of responding to changes in alkaline environment, as well as strategies of resistance that includes the increase in the production of acid by amino diaminasas and acid fermentation of sugars, changes in the properties of the cell surface and increased the expression and activity antiportes cation/proton.

Although these two mechanisms of response *E. Coli*, compared with osmotic stress and alkaline pH, have been reported to crops, when the bacterium is metabolically active, it could be inferred according to the conditions for growth of bacteria that can be more or less adapted to survive these conditions. However, there is not enough information, either in this or in other studies to verify that assertion, it is necessary to

advance research designed to elucidate the mechanisms by which *E. Coli* is able to survive in these environments even when apparently is not metabolically active.

**Key words:** Buffer, Conservation, Fermentation Stability, Viability.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Instituto Nacional de Salud por patrocinar el proyecto y a la Pontificia Universidad Javeriana por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Ivonne Gutiérrez por su paciencia, colaboración y comprensión incondicional.

Al Doctor Saúl por su apoyo, Colaboración y motivación constante.

Y a los profesores que durante nuestra carrera universitaria aportaron sus conocimientos para un mejor aprendizaje.

A nuestros Amigos: Alejandro Rodríguez, Norma Galeano, Paola Díaz, Diana Charry, Erika Delgado, Cesar Díaz, Diana Amaya, Carolina Villamizar y Milena Calderón. A ellos muchísimas Gracias.

## **TABLA DE CONTENIDO**

1.	<b>INTRODUCCION</b> .....	1
2.	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	2
2.1	Generalidades de <i>Escherichia coli</i> .....	2
2.1.1	Pared celular de Bacterias Gram Negativas.....	2
2.1.2.1	Estructura de la Membrana Plasmática.....	2
2.2	Factores físicos y químicos que afectan el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	4
2.2.1	Temperatura.....	4
2.2.2	Actividad de agua (aw).....	5
2.2.3	pH.....	5
2.2.4	Oxígeno.....	6
2.3.6	Nutrientes.....	6
2.3	FERMENTACION DISCONTINUA PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.4	FASES DE CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.5	METODOS DE CONSERVACION BACTERIANA.....	9
2.5.1	Conservación de <i>Escherichia coli</i> a corto plazo.....	10
2.5.1.1	Conservación por suspensión en agua destilada o Buffer fosfatos.....	10
2.5.1.2	Resiembra periódica.....	10
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y REVISION DE ANTECEDENTES.....	11
4.	<b>JUSTIFICACION</b> .....	14
5.	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	15
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6.	<b>METODOLOGIA</b> .....	16
6.1	Producción de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en fermentación discontinua.....	16
6.1.1	OBTENCIÓN DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	16
6.1.1.1	Cepa.....	16
6.1.1.2	Reactivación de la cepa.....	16
6.1.1.3	Elaboración del banco de trabajo.....	16

6.1.2	FERMENTACIÓN.....	17
6.1.2.1	Reactor New Brunswick modelo Biofloc IIC.....	17
6.1.2.2	Medio de Cultivo.....	18
6.1.2.3	Producción de inóculo.....	18
6.1.2.4	Condiciones de fermentación.....	18
6.1.2.5	Seguimiento de la fermentación.....	19
6.1.2.6	Determinación de Biomasa.....	19
6.1.3	Determinación del perfil cinético.....	19
6.2	CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO EN BUFFER FOSFATOS.....	19
6.2.1	Obtención de la biomasa.....	20
6.2.2	Pruebas de estabilidad y viabilidad a diferentes condiciones de pH y Temperatura.....	20
6.3	DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA LA CONSERVACION..	21
6.3.1	Análisis estadístico.....	21
7.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	23
7.1.	Características de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC25922.....	23
7.2	DETERMINACIÓN DEL PERFIL CINÉTICO DE CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	24
7.3	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO, SOBRE LA VIABILIDAD DEL MICROORGANISMO DURANTE LA CONSERVACIÓN CON DIFERENTES SOLUCIONES BUFFER.....	26
7.4	EVALUACION DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES SOLUCIONES SOBRE LA VIABILIDAD DE LA CEPA <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 CONSERVADAS A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS.....	31
7.5	ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN Y FORMULACION DE LA CEPA <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	35
8.	CONCLUSIONES.....	36
	RECOMENDACIONES.....	37
	BIBLIOGRAFIA.....	38
	ANEXOS.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Diseño Experimental utilizando Buffer Fosfatos para la preservación

de *Escherichia coli*.....21

### ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Membrana citoplasmática de las bacterias Gram Negativas.....3

<b>Figura 2.</b>	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en medio nutritivo.....	8
<b>Figura 3.</b>	Esquema general del fermentador y partes del fermentador.....	18
<b>Figura 4.</b>	Características Microscópicas y microscópicas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	23
<b>Figura 5.</b>	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	24
<b>Figura 6.</b>	Fases de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. (A) Fase de crecimiento exponencial y (B) Fase estacionaria.....	25
<b>Figura 7.</b>	Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 25922 conservada en Solución Salina 0.85%(p/v). (A) Log UFC. (B) Porcentaje de viabilidad.....	27
<b>Figura 8.</b>	Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 25922 conservado en Buffer Salino Fosfato pH 7.2.....	29
<b>Figura 9.</b>	Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 25922 conservada en Buffer Salino Fosfatos pH 7.8.....	30
<b>Figura 10.</b>	Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 25922 conservada en Buffer Salino Fosfatos pH 8,3. (A) Log UFC. (B) Porcentaje de viabilidad.....	31
<b>Figura 11.</b>	Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 conservada a 4°C.....	32
<b>Figura 12.</b>	Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de	

*Escherichia coli* ATCC 25922 conservada Temperatura ambiente..33

**Figura 13.** Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de  
*Escherichia coli* ATCC 25922 conservada a 37°C.....33

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias se enfrentan constantemente a condiciones ambientales que limitan o impiden su crecimiento. Sin embargo, su habilidad para colonizar un ambiente requiere la capacidad para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. Las características de las células en estos periodos pueden

analizarse en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y composición del medio de cultivo (Flocari, 1998).

Un buen protocolo para la conservación de microorganismos busca retardar la muerte de los microorganismos; evitar la contaminación y la alteración de características bioquímicas, morfológicas, la secuencia nucleotídica, la estabilidad plasmídica, su reconocimiento inmunológico y su actividad biológica o potencia del producto activo. Para tal efecto una variedad de técnicas han sido validadas y estas incluyen: métodos de conservación a corto plazo como los subcultivos o pases celulares, la conservación en aceite mineral, la utilización de agua estéril y el empleo de soportes inertes; y métodos de conservación a largo plazo, la liofilización y la criopreservación mecánica o el nitrógeno líquido (Flocari, 1998).

Dentro de este contexto, el Instituto Nacional de Salud en el área de Salud Ambiental busca estandarizar un método alternativo a corto plazo para la estabilización y conservación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada como cepa de referencia en el programa PICCAP, cuya finalidad es la optimización de los procesos de control de calidad de agua potable en diversos laboratorios del país.

Con el fin de cumplir con los requerimientos en el Instituto Nacional de Salud, se evaluará en este trabajo la producción de biomasa a partir de *Escherichia coli* utilizando un reactor New Brunswick en operación discontinua, así como la conservación, viabilidad y estabilidad de este microorganismo empleando técnicas alternativas a las que se utilizan actualmente en el Instituto Nacional de Salud, tal como la utilización de diferentes tipos de buffer fosfato como método de conservación a corto plazo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 GENERALIDADES DE *Escherichia coli***

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, con unas dimensiones de 0.5 x 1.0 a 3.0. micras, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos y reductores de nitratos a nitritos (Bergey, 1989).

Se cultivan en medios comunes, incluso a temperaturas de 45°C ya que son organismos termotolerantes, permitiendo diferenciarlos de los demás coliformes. Son capaces de desarrollarse en todos los medios y forman colonias distintivas en los medios selectivos dependiendo de sus propiedades metabólicas y de los componentes del medio (Bergey, 1989).

### **2.1.1 Pared celular de Bacterias Gram Negativas**

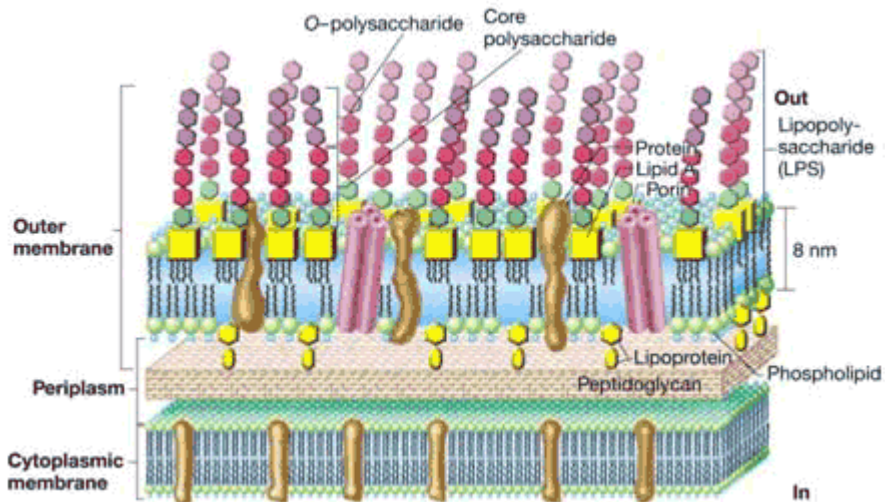
La pared celular de las bacterias Gram negativas, está compuesta por una capa delgada de peptidoglicano que esta formada por dos derivados de azúcares N-acetil glucosamina y N-acetil murámico y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L- alanina D-alanina D-glutámico y Glicina y en otros casos ácido diaminopimélico, además esta constituido por una fina lamina en las que las cadenas de azúcares se conectan entre si por puentes formados por aminoácidos, estos puentes se establecen por lo general mediante enlaces peptídicos directos del grupo amino del diaminopimélico y el grupo carboxilo de la D-alanina terminal (Madigan, 1998).

### **2.1.2 Estructura de la Membrana Plasmática**

La membrana bacteriana es una bicapa lipídica hidrofóbica compuesta por ácidos grasos, así como unidades hidrofílicas como el glicerol. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa está el espacio periplásmico donde se

encuentra el periplasma el cual contiene las enzimas necesarias para la nutrición de las bacterias (Madigan, 1999).

La membrana externa está formada por diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteicos, que actúan como canales de entrada y salidas de sustancias hidrofóbicas de bajo peso molecular, existiendo porinas específicas e inespecíficas. Las porinas inespecíficas forman canales rellenos de agua a través de las cuales se produce el paso de sustancias pequeñas y las específicas contienen un sitio de unión específico para una o más sustancias. (Figura 1). El lipopolisacárido está formado por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina) (Madigan, 1999).



**Figura 1.** Membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas (Madigan ,1999).

Investigadores han observado que las bajas temperaturas tienen un efecto directo sobre la fluidez de la membrana provocándose por ello la detención de los procesos de transporte a través de la membrana y por lo tanto, el recambio de protones (Sánchez y Corrales, 2005). Esto se debe a que existe, una alta proporción de los ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de las membranas, permitiendo que la fluidez sea óptima a cualquier temperatura de crecimiento. En *Escherichia coli*, los ácidos grasos se sintetizan mediante una ruta metabólica ramificada. Una rama

lleva a ácidos grasos saturados y la otra a ácidos grasos insaturados, cuando aumenta la temperatura, la enzima que se encuentra cerca del punto de ramificación en la parte insaturada disminuye su actividad permitiendo que se fabriquen más ácidos grasos mediante la rama "saturada". Cuando disminuye la temperatura, ocurre lo contrario (Marr, 1991).

## **2.2 FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*.**

### **2.2.1 Temperatura**

Un estudio detallado del crecimiento de *E. coli* con respecto a la temperatura, demuestra que la temperatura óptima en un medio rico y complejo es de 39°C, la máxima es de 48°C y la mínima es de 8°C, estos valores están sujetos a pequeñas diferencias según los medios empleados (Madigan, 1999).

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas (Kirsop y Snell, 1984).

Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular es lento y las células paran de crecer; aunque suelen morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura (Kirsop y Snell, 1984).

### **2.2.2 Actividad de agua (aw)**

Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P0). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR) (Scragg, 2002).

El valor de la actividad de agua, da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente, un 80% o más de la masa de una bacteria es agua y durante el crecimiento, los nutrientes y productos de desecho entran y salen de la célula, por ello, las bacterias pueden crecer solo sobre materiales que tengan la adecuada cantidad de agua libre (disponible) (Atkinson, 1986).

Los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son los siguientes: bacterias  $a_w > 0.90$ , levaduras  $a_w > 0.85$ , hongos filamentosos  $a_w > 0.80$ . Para el caso específico de *E. coli* requiere un  $a_w$  de alrededor de 0.995 (Madigan, 1999).

### **2.2.3 pH**

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente. La mayoría de las bacterias como *Escherichia coli* tienen su óptimo de crecimiento a pH 7 (neutro), el pH interno se mantiene en un valor muy cercano a 7,6 siendo el valor óptimo para su metabolismo. *Escherichia coli*, al igual que la mayoría de las demás bacterias, pueden realizar reacciones metabólicas vitales sólo dentro de un intervalo de pH limitado, porque muchas de sus enzimas funcionan adecuadamente sólo en un intervalo estrecho de pH (Atkinson, 1986).

El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0 (Atkinson, 1986).

#### **2.2.4 Oxígeno**

Los microorganismos pueden ser divididos en diversos grupos dependiendo del efecto del oxígeno. Los *aerobios* son capaces de crecer con tensión de oxígeno total (21%) y muchos pueden soportar concentraciones más altas (Madigan, 1999).

*E. coli* es un microorganismo que se encuentra dentro del grupo de los aerobios facultativos, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria cuando está disponible, y en ausencia de oxígeno la energía la obtienen por fermentación o respiración anaerobia (generalmente el  $\text{NO}_3^-$  es un aceptor final de electrones) (Crueger, 1993).

#### **2.2.5 Nutrientes**

*E. coli* puede crecer a partir de una gran variedad de fuentes de carbono y de energía como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc. Los nutrientes pueden ser divididos en dos grupos 1) Macronutrientes y 2) Micronutrientes, la mayoría de las bacterias requieren un compuesto orgánico de algún tipo como fuente de carbono, tales como aminoácidos, ácidos grasos y compuestos aromáticos. En peso seco, una célula consta de 50% de carbono y a su vez este es el elemento mayoritario de las macromoléculas (Madigan 1999).

### **2.3 FERMENTACIÓN DISCONTINUA PARA LA PRODUCCIÓN DE *Escherichia coli*.**

El tiempo requerido para una fermentación discontinua varía de horas a semanas dependiendo de la conversión que se desee y de las condiciones utilizadas. Durante este tiempo debe evitarse la contaminación debiendo agitarse el contenido del tanque y mantener controlada su temperatura (Atkinson, 1986). Una adecuada agitación es esencial, ya que produce los siguientes efectos en las tres fases:

- Dispersión del aire en la solución de nutrientes.

- Homogeneización, para igualar la temperatura, pH y concentración de nutrientes, en el fermentador.
- Suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos.
- Dispersión de los líquidos inmiscibles (Doran, 1995).

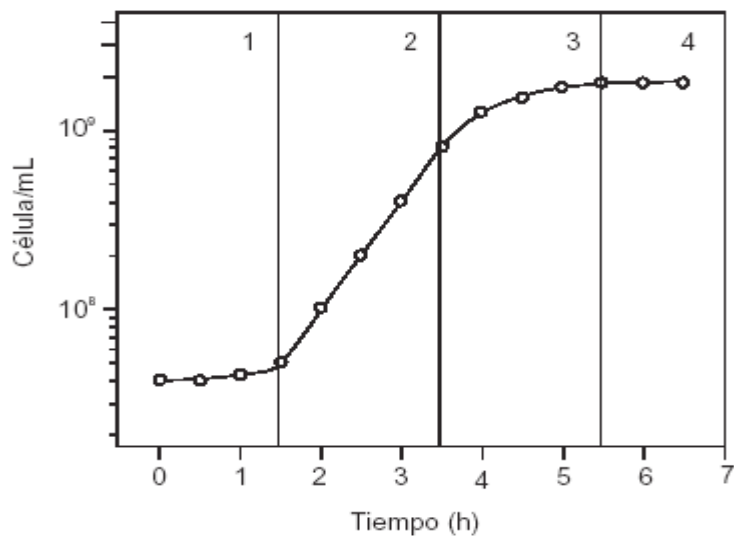
Por lo cual, se podría concluir que cuanto mayor sea la agitación, mejor será el crecimiento. Sin embargo, la agitación excesiva puede romper las células grandes e incrementar la temperatura lo que ocasiona un descenso en la viabilidad celular (Denbigh, 1970).

En cuanto a la temperatura, debe ser en lo posible constante, ya que un aumento de la temperatura supone un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno y por encima de los 40°C, la solubilidad del oxígeno disminuye de forma apreciable, lo que influye negativamente sobre la fuerza impulsora y sobre la velocidad de transferencia de materia (Doran, 1995).

Además estos procesos operan en sistemas cerrados de manera que el sustrato se añade al comienzo del proceso donde se pueden observar las fases de crecimiento del microorganismo hasta que agote sus nutrientes y termina en fase de muerte. Donde a su vez los productos son retirados solo al finalizar el mismo (Doran, 1995).

#### **2.4 FASES DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli***

Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos y su cultivo en condiciones fisiológicas se observan cuatro fases típicas de crecimiento: Fase de latencia, Fase logarítmica o exponencial Fase estacionaria y fase de muerte (Crueger, 1993) (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en medio nutritivo. 1) fase de latencia o de adaptación. 2) fase logarítmica o exponencial 3) fase de transición 4) fase estacionaria (Crueger, 1993).

Cuando las bacterias se introducen en un medio líquido nuevo, la división celular no puede comenzar inmediatamente: puede haber una fase de latencia inicial en la que apenas se dan divisiones celulares. Durante la fase de latencia las células se están adaptando al nuevo ambiente. La longitud de la fase de latencia dependerá principalmente de las condiciones en que estaban las células antes de ser introducidas en el medio (Crueger, 1993).

Una vez adaptadas las bacterias al nuevo medio, las células comienzan a crecer y dividirse a una tasa que es máxima para la especie en las condiciones existentes, esta es la fase logarítmica o fase exponencial, en esta fase las células se duplican a velocidad constante (Atkinson, 1986).

Por lo tanto, cuando un nutriente esencial del medio de cultivo se acaba, o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del crecimiento exponencial, la población entonces alcanza la fase estacionaria. En esta fase no hay incremento neto o decremento del número de

células. Sin embargo todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos (Madigan, 1999).

En esta fase disminuye el volumen celular y la forma se redondea, se engrosa la pared, disminuye el número de flagelos y se incrementa la resistencia celular a condiciones adversas. El metabolismo se reorganiza, se acumulan compuestos de reserva y aumenta la degradación de macromoléculas (Ramírez y Ferrat, 2005).

Una vez que la mayoría de las células ha muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años. Dicha persistencia puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan, observándose recambio celular (Scragg, 2002).

Por lo cual, es importante observar las fases de crecimiento del microorganismo, ya que si se quiere realizar una adecuada conservación, lo ideal es que el microorganismo se encuentre en el final de la fase exponencial y en el inicio de fase la estacionaria, por que es aquí donde se presenta la mayor cantidad de células viables, para la cual es se debe realizar una fermentación. (Kirsop, 1984).

## **2.5 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN BACTERIANA**

Los métodos de conservación deben garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable (Weng, 2005).

Variadas técnicas se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos y para eso debe considerarse lo recomendado por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, siglas en inglés), en sus guías generales, la cual enuncia que por seguridad y para minimizar la probabilidad de

pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos 2 procedimientos diferentes (Weng y Diaz, 2005).

### **2.5.1 Conservación de *Escherichia coli* a corto plazo**

#### **2.5.1.1 Conservación por suspensión en agua destilada y Buffer Fosfato Salino**

El agua destilada es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Igualmente, los buffer fosfatos (Tampones) son utilizados como método de preservación ya que son sales inorgánicas, por lo general soluciones de ácidos débiles y de sus bases conjugadas o de bases débiles y sus ácidos conjugados que incluyen el fosfato dibásico y monobásico de potasio. Se puede hacer una solución común de fosfato de potasio en un pH deseado, mezclando la acción monobásica y dibásica. Para tener un pH cerca de la neutralidad Para ambos métodos la concentración celular inicial debe ser de aproximadamente a  $10^9$  células/ml en el caso de bacterias y levaduras (Liao y Shollenberger, 2003; Shriver, 1998; Fiñana y Cejudo, 2000).

#### **2.5.1.2 Resiembra periódica**

Es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo. Se basa en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, lo que condiciona el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales constituyen sus principales desventajas (Weng y Diaz, 2005).

### 3. REVISIÓN DE ANTECEDENTES

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud con el [Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables - PICCAP](#), busca contribuir al mejoramiento de la calidad del agua potable, dando cumplimiento al artículo 34 del decreto 475 de 1998, garantizando fiabilidad de los resultados y promoviendo la estandarización de métodos para análisis de aguas de consumo humano.

Dentro del programa PICCAP que encabeza el INS, se utiliza la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como material de referencia, ya que es un microorganismo indicador de contaminación en agua; el cual es constituyente normal de la flora intestinal de individuos y animales, se presenta en número elevado, es fácil de aislar y cuantificar y no es patógeno (Borrego, 1987).

El programa consta de 3 envíos al año de muestras sintéticas que se preparan haciendo suspensiones en solución salina, de microorganismos de interés sanitario en aguas para consumo humano. Para esto se cultiva la bacteria en caldo nutritivo, por 18 a 24 horas a 37°C, se realizan diluciones de estos microorganismos de acuerdo al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland y se envasan en ampollas de vidrio de 20 ml, se rotulan y se empacan en estuches de icopor. Posteriormente se envían a los laboratorios participantes, indicándoles en cada envío la fecha límite para reporte de los resultados.

Los valores recibidos son sometidos a un análisis estadístico para el establecimiento de resultados válidos, cálculo de la media corregida ( $\bar{X}$ ) y su desviación estándar (DS), índice de variación (I.V), índice de variación medio (I.V.M).

Hasta la fecha se han realizado pocos estudios a nivel nacional e internacional, en cuanto a la estabilidad y viabilidad de este microorganismo utilizando métodos de conservación alternativos a corto plazo, utilizando buffer fosfatos y agua destilada. Sin embargo, estos métodos por ser fáciles y económicos para la preservación de cultivos bacterianos, son útiles para laboratorios no equipados del liofilizadores o ultracongelación como el Instituto Nacional de Salud.

Dentro de los factores más importantes en la preservación y protección de microorganismos que se han estudiado se encuentra, la densidad de la suspensión, la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, la composición de la solución, el pH y la influencia de la temperatura son factores importantes en la preservación de la cantidad y protección de las células (Doneva, 2004).

De esta manera Kelman en 1956 reportó que la viabilidad de la bacteria *Ralstonia solanacearum* se mantuvo en agua durante varios años, y estudios posteriores realizados por Wakimoto y Utatsu en 1982 y Van Elsas y Kastelein en el año 2001, demostraron que *Ralstonia solanacearum* no solo sobrevivió sino también se multiplicó por varias generaciones en agua pura. En 1986, Lacobelis y De Vay reportaron que otras bacterias fitopatógenas incluyendo *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pudieron sobrevivir en agua estéril cerca de 20 años. En el año 2003, Liao y Shollenberger buscaron conservar microorganismos Gram positivos y Gram negativos en agua y en buffer fosfatos demostrando que las bacterias Gram positivas no se conservaron adecuadamente en agua mientras que algunas Gram negativas lograron conservarse, sin embargo, al emplear los Buffer fosfatos tanto las bacterias Gram positivas y Gram negativas lograron conservarse por varios años.

A pesar de la simplicidad, la preservación de cultivos bacterianos en agua no se ha adoptado en laboratorios de microbiología, debido a la carencia de datos experimentales ya que no se ha podido confirmar la confiabilidad de este método. Además, no se ha investigado si el método de la preservación del agua se puede aplicar a las bacterias que son de importancia clínica, industrial o ambiental (Liao y Shollenberger, 2003).

Por otra parte, se han realizado dos estudios en el INS referentes a la producción y estabilización de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, el primer estudio fue llevado a cabo en el año 2002 por Beltrán, en el cual se diseñó un quimiostato para fermentación continua, discontinua y discontinua alimentada a escala de laboratorio, teniendo en cuenta dos parámetros fundamentales como son: mantener un medio homogéneo sin zonas muertas y a la vez transferir oxígeno al medio empleando el

mínimo de energía posible y evitando cualquier tipo de contaminación que influyera en el proceso. Además se evaluaron parámetros físicos como pH, temperatura, nivel de espuma, entre otros. De esta manera se consiguió establecer los parámetros cinéticos del microorganismo, las variables incidentes, el funcionamiento del reactor y el sistema en general y llegar así al diseño óptimo del fermentador.

El segundo estudio se llevo a cabo en 2002 por Bustacara y Castañeda, donde se optimizó el sistema de cultivo continuo utilizando el quimiostato diseñado en el estudio anterior, se determinó la velocidad de crecimiento y se midieron variables como pH, temperatura, nivel de líquido, nivel de espuma y variables biológicas (recuento en placa).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos más importantes en la preparación de material de referencia vivo, es el de preservarlo en condiciones que garanticen su viabilidad y estabilidad genética, de manera que los resultados que se generen sean confiables y reproducibles. Por esta razón, el laboratorio de Salud Ambiental del Instituto Nacional de Salud, responsable del programa PICCAP, está empeñado en estandarizar una metodología adecuada que garantice la viabilidad y estabilidad de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada como cepa de referencia en el programa interlaboratorios para el control de calidad de agua potable. Ya que en este momento no se puede certificar la fiabilidad de los resultados debido a que el microorganismo no presenta viabilidad durante los tres envíos que se realizan al año.

Dentro de este contexto el presente trabajo evaluó la producción de biomasa a partir de *E. coli* utilizando un reactor New Brunswick en operación discontinua, con el fin de determinar la hora a la cual el microorganismo puede ser utilizado para dar inicio al proceso de conservación.

Por otro lado, se evaluó tanto la solución salina utilizada actualmente como método de preservación en el Instituto Nacional de Salud como diferentes tipos de buffer fosfato, para observar si la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se mantiene viable en el transcurso del tiempo teniendo en cuenta las condiciones de pH y temperaturas evaluadas. El resultado final del proyecto es un protocolo para la producción y formulación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 para ser utilizada como patrón de referencia en el programa PICCAP del Instituto Nacional de Salud.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarizar un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.2.1 Determinar el perfil cinético de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 mediante fermentación discontinua empleando las condiciones de cultivo establecidas en la literatura (aireación, temperatura, agitación).
- 5.2.2 Evaluar la viabilidad de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en solución salina y en buffer fosfato (pH 7.2, 7.8, y 8.3) durante los veinte días de estudio.
- 5.2.3 Evaluar el efecto de la temperatura (ambiente, 4°C y 37°C) y el tiempo, sobre el comportamiento del microorganismo durante la conservación, mediante pruebas de viabilidad acelerada.
- 5.2.4 Establecer el pH más apropiado para la conservación de *Escherichia coli* ATCC 25922, empleando diferentes buffer fosfatos mediante pruebas de estabilidad y viabilidad.
- 5.2.5 Proponer un protocolo que cumpla con las normas del Instituto Nacional De Salud, para la producción y formulación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 para ser utilizada como patrón de referencia en el programa PICCAP del Instituto Nacional de Salud.

## **6. METODOLOGÍA**

El estudio se desarrolló en dos partes, en la primera etapa se evaluó la producción de biomasa de *Escherichia coli* ATCC 25922 empleando fermentación discontinua utilizando caldo BHI y en la segunda se estudió un método alternativo de conservación a corto plazo utilizando buffer fosfatos.

### **6.1 PRODUCCIÓN DE *Escherichia coli* ATCC 25922 EN FERMENTACIÓN DISCONTINUA**

#### **6.1.1 OBTENCIÓN DE *E. coli* ATCC 25922**

##### **6.1.1.1 Cepa**

La cepa se obtuvo a partir de un liofilizado, suministrado por el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS).

##### **6.1.1.2 Reactivación de la cepa**

Se desinfectó previamente el tapón del vial, y se hidrató el liofilizado, inyectando en el vial 1 ml de caldo BHI, la composición y preparación se describen en el anexo 1 (Merck, 1994). A partir de este se tomó la suspensión, la cual se sembró en agar BHI durante 24 horas a 37°C. Verificando pureza mediante Coloración de Gram.

##### **6.1.1.3 Elaboración del banco de trabajo**

Se estableció un banco de trabajo de 160 viales utilizando glicerol a una concentración del 30% (v/v) y caldo BHI, en tubos eppendorf con un volumen final de 1.5 ml, de la siguiente manera: Se realizó un pase por triplicado en agar BHI durante 24 horas a 37°C al cabo de las cuales se verificó la pureza mediante coloración de Gram. Posteriormente se prepararon 15 ml de una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85% (p/v), con una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  cel/ ml (tubo 0.5 Mc Farland).

Se utilizó un erlenmeyer con capacidad total de 250 ml con un volumen efectivo de trabajo de 125 ml. Se inocularon 12.5 ml (10% VET) de la suspensión de *Escherichia coli* en 112.5 ml de caldo BHI estéril. Se Incubó por 12 horas a 37°C y 150 rpm. Se realizaron pruebas de pureza mediante coloración de Gram.

Se prepararon 125 ml de caldo BHI estéril más glicerol de manera que la concentración final fue del 30% (v/v) y se mezclaron con los 125 ml del cultivo obtenido como se describió anteriormente, se dispensaron 1,5 ml de esta mezcla en tubos eppendorf y se llevó a conservar en congelación (entre -2°C y -4°C).

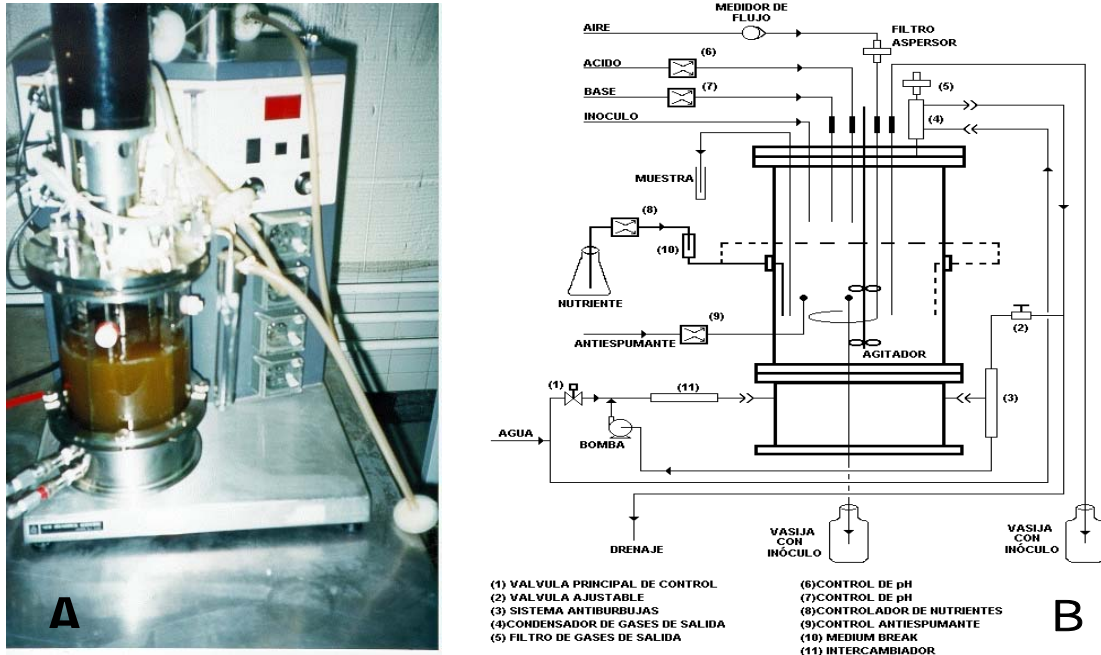
Se tomaron 5 viales al azar al finalizar el banco de trabajo para realizar pruebas de pureza y viabilidad (Garzón y Gómez, 2006).

### **6.1.2 FERMENTACIÓN**

Se realizaron tres fermentaciones a las mismas condiciones en un fermentador New Brunswick. Las condiciones de fermentación que se usaron fueron:

#### **6.1.2.1 Reactor New Brunswick modelo BIOFLO IIC**

Este fermentador dispone de un vaso de vidrio removible, resistente a la exposición en autoclave, con una capacidad total de 5 litros. El vaso se ensambla en un intercambiador de calor de tipo camisa cuya función es mantener constante la temperatura del medio durante el tiempo de fermentación. Contiene cuatro deflectores y dos impulsores tipo Rushton con 6 paletas planas. Cuenta además con un microprocesador controlador de pH, agitación, temperatura, oxígeno disuelto, alimentación de nutrientes y controlador electrónico de espuma. Los controladores, las bombas peristálticas y la base para colocar el vaso de fermentación están ubicados sobre una consola por medio de la cual se activa el sistema (Castañeda, 2003).



**Fig. 3.** (A) Esquema general del fermentador. (B) Partes del fermentador (Scragg 2002)

### 6.1.2.2 Medio de Cultivo

Para la producción del inóculo y el cultivo en el biorreactor se utilizó el caldo BHI.

### 6.1.2.3 Producción del inóculo

Se utilizó un erlenmeyer de 1000 ml para trabajar con un volumen efectivo de 500 ml (VET), se inocularon 50 ml (10% VET) de una suspensión de *Escherichia coli* (Tubo 0.5 Mc Farland), preparada a partir de un cultivo en agar BHI, en 450 ml de caldo estéril. Se incubó por 12 horas a 37°C, 150 rpm verificando pureza mediante coloración de Gram.

### 6.1.2.4 Condiciones de la fermentación

Se trabajó con un volumen efectivo de 3750 ml ya que el reactor a utilizar tiene una capacidad total de 5 l, este se esterilizó con 3375 ml de caldo en autoclave a 121°C

por 35 minutos y posteriormente se inóculo con 375 ml de cultivo (10% VET) a través del tubo de inoculación, utilizando para ello una jeringa automática. La temperatura de cultivo fue de 37°C con una agitación de 150 rpm y una aireación de 1 vvm (Garzón, 2006).

#### **6.1.2.5 Seguimiento de la fermentación**

Inmediatamente después de la inoculación se tomo la muestra correspondiente a la hora 0, luego cada media hora hasta la hora 2, posteriormente cada 2 horas hasta la hora 22. Para cada tiempo de fermentación se tomaron 50 ml para la determinación de biomasa.

#### **6.1.2.6 Determinación de Biomasa**

Las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 5000rpm, para separar el sobrenadante y el pellet, este último se lavó una vez con solución salina al 0.85% (p/v) por 30 min a 5000 rpm y posteriormente se resuspendió al volumen inicial (50 ml). Se leyó por absorbancia a 540nm, utilizando un espectrofotómetro Génesis 5 (SPECTRONIC®MILTON ROY) usando como blanco solución salina. Los datos obtenidos se convirtieron a concentración de células en g/L, por medio de la ecuación obtenida de la curva de peso seco (Elaboración de la curva peso seco Anexo 2, numeral 4).

#### **6.1.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL CINÉTICO**

A partir del promedio de los datos de biomasa obtenidos de las tres fermentaciones, se construyó la curva de crecimiento y se determinaron las fases para las condiciones de cultivo evaluadas.

#### **6.2 CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO EN BUFFER FOSFATOS**

Se realizó una nueva fermentación (según lo descrito en el numeral 6.1.2.3 y 6.1.2.4) de la cual se cosechó la biomasa obtenida al inicio de la fase estacionaria

(ver numeral 6.1.2.5), este tiempo se determinó según el perfil cinético obtenido en la primera etapa del trabajo.

### **6.2.1 OBTENCIÓN DE LA BIOMASA**

Para separar la biomasa del medio de cultivo se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm y se lavó dos veces con solución salina al 0,85% (p/v).

### **6.2.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD Y VIABILIDAD A DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA**

Inicialmente se prepararon tres soluciones buffer fosfato a diferentes pH: 7.2, 7.8 y 8.3 (Anexo 3), como patrón se utilizó solución salina al 0.85% (p/v) usada para preservar la cepa en el INS. A partir de la biomasa obtenida como se describió anteriormente (numeral 6.2.1), se prepararon suspensiones celulares en cada una de las soluciones buffer y en la solución patrón, con una concentración final de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  cel/ml, correspondiente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland.

Para determinar la población celular exacta con la cual se inicia la evaluación, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-9}$  de cada una de las suspensiones a evaluar y se sembraron por triplicado en superficie 0.1ml en medio BHI, se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizó recuento de la población inicial (UFC/ml) verificando la pureza mediante coloración de Gram.

De cada una de las suspensiones se preparó un lote de 360 viales con un volumen de 15 ml c/u, ya que es la cantidad de suspensión utilizada en el INS para el programa PICCAP, estos viales se distribuyeron en 3 grupos de 120 viales y cada grupo se almacenó a una temperatura diferente (ambiente, 37°C y 4°C), el tiempo de almacenamiento fue de 20 días, tomando cada 5 días al azar 2 viales de cada grupo, ya que no se retiró mas del 10% de los viales. Posteriormente se realizó coloración de Gram y recuento de la población (UFC/ml), para determinar el

comportamiento de la viabilidad celular en función del tiempo para cada una de las condiciones de pH y temperaturas evaluadas.

### 6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA LA CONSERVACIÓN

Se utilizó un diseño experimental factorial  $3^2$ , 2 factores: pH y temperatura; cada una con 3 niveles: pH, 7.2, 7.8 y 8.3; Temperatura, 4°C, T°ambiente y 37°C. Para un total de 9 experimentos, así:

**Tabla 1.** Diseño Experimental utilizando Buffer Fosfatos para la preservación de E. coli ATCC 25922 ( 2006)

		Temperatura		
		4°C	T° ambiente	37°C
pH	7.2	Exp 1	Exp 4	Exp 7
	7.8	Exp 2	Exp 5	Exp 8
	8.3	Exp 3	Exp 6	Exp 9

Para la solución salina 0.85 % (p/v) usada como patrón en el INS, se manejó como única variable la temperatura (4°C, T°ambiente y 37°C).

### 6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey. Para determinar si entre los niveles de cada factor hay diferencias significativas en la densidad poblacional. La variable respuesta fue el recuento de células viables expresado en UFC/mL.

La hipótesis nula es la igualdad de medias entre los niveles para cada factor, y la  $H_a$ : Al menos dos son diferentes así:

#### Anova

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_t$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_k, \text{ donde } i \neq k.$$

### **Tukey**

Para el factor pH:

*Ho: 7.2 = 7.8 = 8.3*

*Ha: Al menos dos son diferentes*

Para el factor temperatura las hipótesis serán:

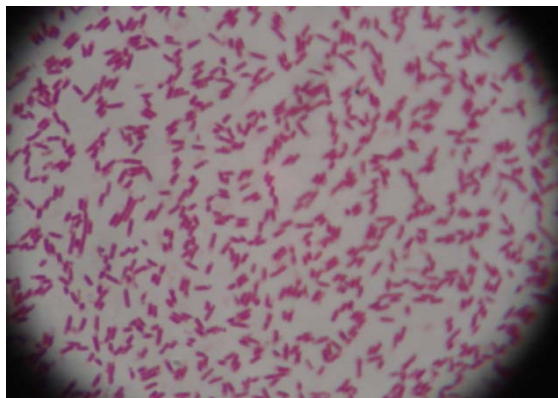
*Ho: 4°C = T°Amb = 37°C*

*Ha: Al menos dos son diferentes*

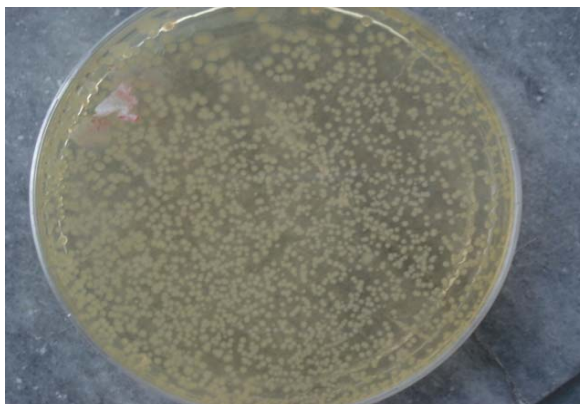
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Características de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

Las características tanto macroscópicas como microscópicas fueron observadas durante el proceso de conservación, indicando ausencia de contaminantes ya que *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, corto, recto, no esporulado (Figura 4A) caracterizado por ser de colonias lisas, pequeñas, convexas, húmedas, y mucoides (Figura 4B).



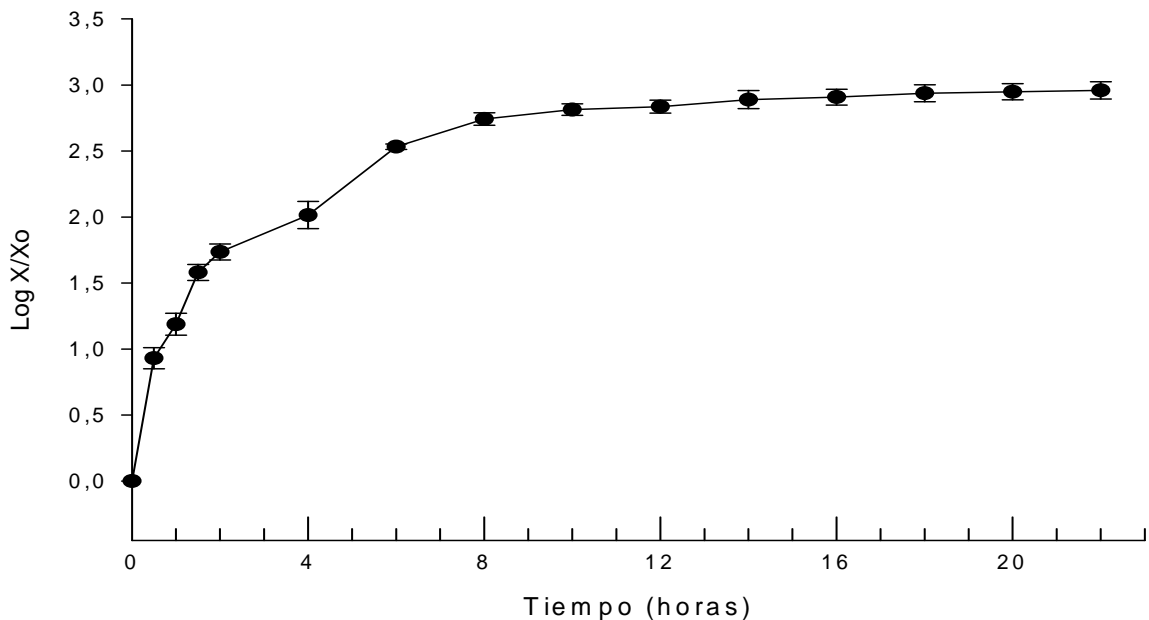
**Figura 4A.** Características Microscópicas de *Escherichia coli* ATCC 25922



**Figura 4B.** Características Macroscópicas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en agar BHI

## 7.2 Determinación del perfil cinético de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922

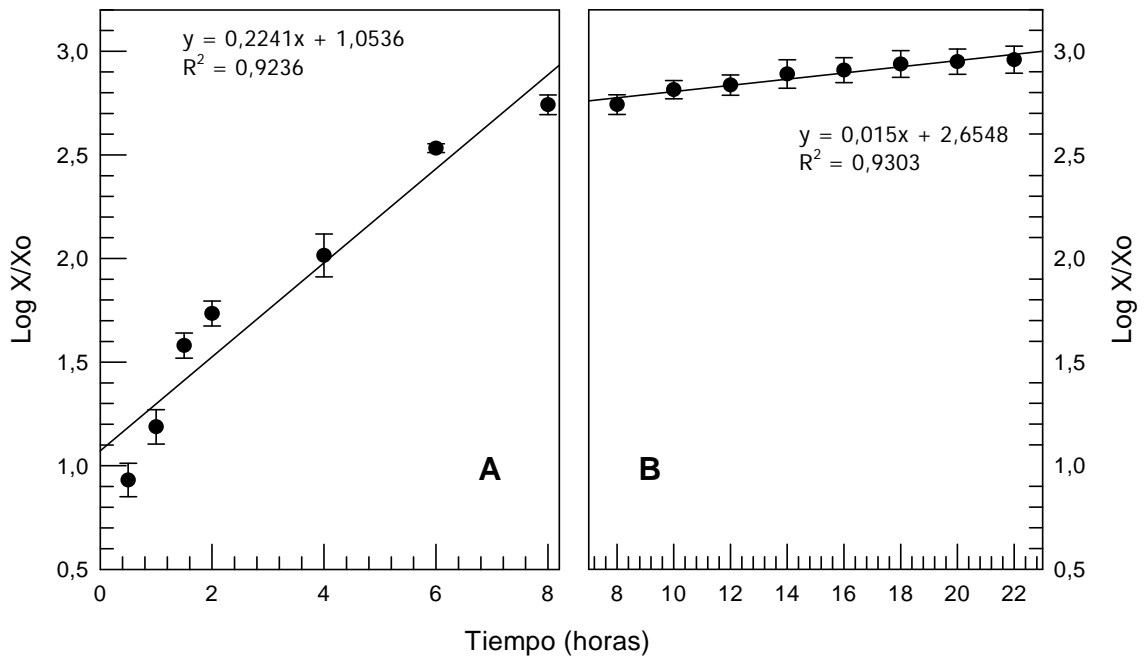
En la figura 5 se muestra el comportamiento cinético promedio de las tres fermentaciones realizadas en caldo BHI (Ver Anexo 4), se observa que el microorganismo no presenta fase de latencia, posiblemente porque se encontraba adaptado ya que previamente había estado bajo condiciones de temperatura, aireación y nutrición similares a las de la fermentación, presentando un crecimiento exponencial desde la hora 0 hasta la hora 8, con una velocidad de crecimiento de  $0.2241 \text{ h}^{-1}$  y con un tiempo de duplicación de 3.09 h, como se observa en la figura 6A.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922

Estudios anteriores realizados en el INS con la misma cepa reportan resultados similares, donde se obtuvo una velocidad de crecimiento de  $0.2363 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 2.93 h utilizando un quimiostato en operación discontinua (Bustacara y Castañeda, 2002). De igual manera estos resultados concuerdan con los obtenidos para otras cepas de *E. coli*, Johan Larsson en el 2001 describió el desarrollo y optimización de un proceso de fermentación discontinua usando seis

fermentadores con capacidad de un litro para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* en caldo BHI, midiendo variables como pH, tiempo de cultivo, temperatura, donde la expresión óptima de la proteína fue con un tiempo de cultivo de 17.8 h, a 36.7°C, con un pH de 6.8 y una velocidad específica de crecimiento de 0.23h<sup>-1</sup>. Ching-ping y colaboradores en el 2000, estudiaron la actividad de tres tipos de fumarasas en *E. coli* que catalizan la conversión del fumarato al L- malato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, este estudio se llevó a cabo en un cultivo continuo durante 14h utilizando glucosa o acetato como fuente limitante de carbono, se estableció que un cambio en el crecimiento celular permite la variación de la actividad de la fumarasa cuando hay diferentes tipos de sustratos, donde la velocidad de crecimiento máxima para la actividad de la fumarasa, fue de 0.24 h<sup>-1</sup>.



**Figura 6.** Fases de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922. (A) Fase de crecimiento exponencial y (B) Fase de desaceleración

Por otro lado, en la figura 6B se muestra una fase de desaceleración del crecimiento a partir de la hora 8 hasta la hora 22, que no podría considerarse fase estacionaria ya que se observa aumento de la concentración celular (Quintero, 1987). Sin embargo, tampoco puede ser clasificada como exponencial ya que el microorganismo disminuyó en un 93% la velocidad de crecimiento (de  $0.2241 \text{ h}^{-1}$  a  $0.015 \text{ h}^{-1}$ ). Autores como Carbonell y Corchero en el año 2002, describen esta fase en *E. coli*, como una fase de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria, debida a diferentes factores como presencia de microambientes anaeróbicos, acidificación del medio, disponibilidad de nutrientes, así como otros mecanismos más sofisticados de comunicación intracelular que contribuyen a regular la división celular y por lo tanto la densidad de células en el cultivo.

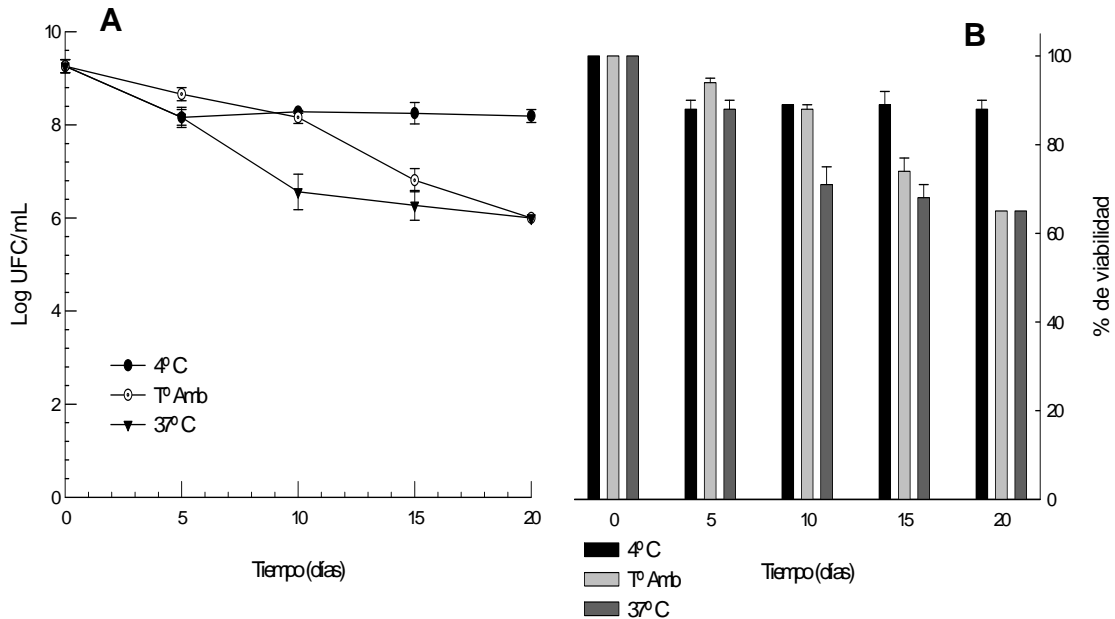
Para establecer la edad de las células al inicio del proceso de conservación se tuvieron en cuenta tanto las condiciones óptimas de cultivo, como los datos arrojados por la cinética de crecimiento, debido a que se requieren mínimo  $10^7$  células/ml para garantizar una adecuada recuperación (Nunc, 2000). Por tanto se eligió la hora ocho (periodo comprendido entre el final de la fase exponencial y el inicio de la fase de desaceleración), ya que es donde se presentó la mayor cantidad de células durante todo el proceso de fermentación.

Adicionalmente, los cambios en el metabolismo general, el aumento de compuestos de reserva y de osmoprotección, los cambios de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes contribuyen a que las células al principio de esta fase mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés (Ramírez y Ferrat 2005).

### **7.3 Evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo, sobre la viabilidad del microorganismo durante la conservación con diferentes soluciones buffer**

Las suspensiones celulares preparadas en diferentes buffer fosfato y solución salina se almacenaron a tres diferentes temperaturas (refrigeración, ambiente y  $37^\circ\text{C}$ ), durante un periodo de 20 días para observar el comportamiento de la viabilidad y

estabilidad de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ver anexo 5).



**Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada en Solución Salina 0,85% (p/v). (A) Log UFC. (B) % de viabilidad.

En la figura 7, se observa que respecto al recuento inicial ( $1.88 \times 10^9$  UFC/ml), la población celular en solución salina a temperatura de refrigeración, presentó una disminución en una unidad logarítmica durante los primeros cinco días; sin embargo, se mantuvo estable durante los días restantes de estudio. Esto puede deberse a que las células entran en un estado de latencia, disminuyendo su velocidad metabólica, a tal punto que su metabolismo se hace imperceptible, pero suficiente para mantener al microorganismo vivo (Sánchez, 2005). Cuando la temperatura disminuye se bloquea la iniciación de la síntesis de proteínas, en *E. coli* existe un regulador de transcripción, el CspA, que reconoce los promotores del gen produciendo las proteínas de choque en frío (Csp's), que estabilizan el mRNA de manera que pueda reiniciarse la producción de proteínas. Además, dentro de la membrana de la célula la composición de los fosfolípidos y los glicolípidos cambia, ya que se incrementa la cantidad de ácidos grasos insaturados a expensas de los ácidos grasos saturados, formando una bicapa con los grupos principales polares en

las superficies intracelulares y extracelulares. Las cadenas acil del ácido graso se unen con los grupos metílicos terminales situados en el interior de la bicapa para asegurar la función de la membrana tal como actividad enzimática y transporte de solutos (Beales, 2004).

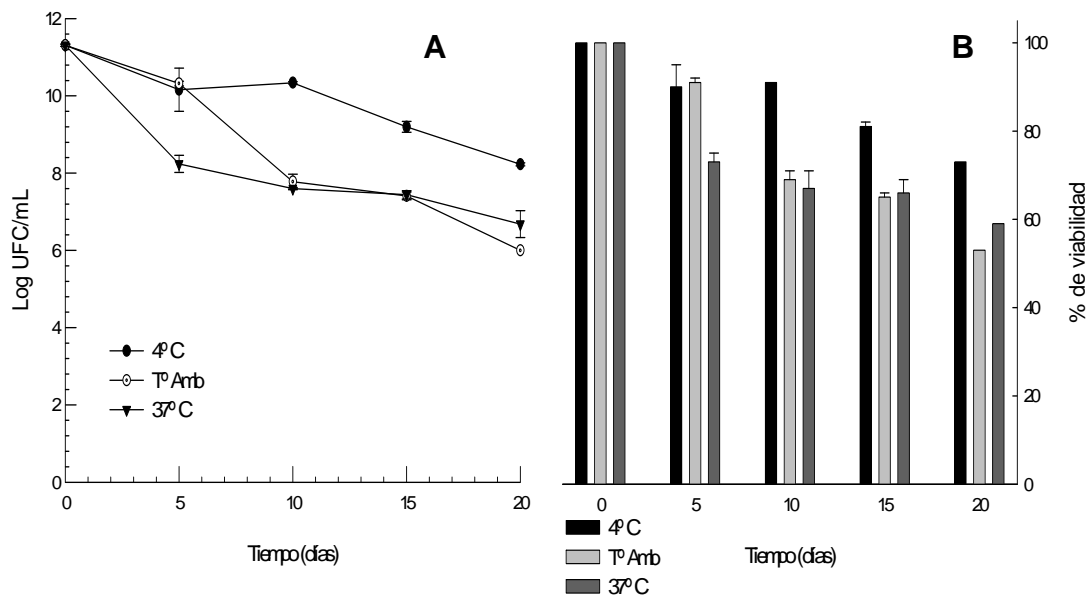
Mientras que a temperatura ambiente y 37°C (figura 7), la población celular disminuyó a través del tiempo en tres unidades logarítmicas, debido probablemente a que el metabolismo en ambas condiciones pudo acelerarse como efecto de la temperatura, llevando a que la población celular disminuyera, presentándose una desnaturalización de proteínas y alteraciones producidas en las membranas lipídicas, generando cambios en la barrera de permeabilidad (Singleton 2004). Este comportamiento puede verse influenciado por las características propias de la cepa, Hyun y Douglas en el 2003, compararon la resistencia al calor de *E. coli* 0157:H7 y *E. coli* ATCC 25922, encontrando que *E. coli* 0157:H7 tuvo mayor resistencia al calor ya que posee la proteína *rpoS*, una proteína de fase estacionaria que incrementa la resistencia al calor al ser sometida a una temperatura mayor a la del crecimiento óptimo, mientras que *E. coli* ATCC 25922, quien no produce dicha proteína, tuvo menor resistencia perdiendo estabilidad al ser sometida a una temperatura constante de 37°C.

Con respecto al porcentaje de viabilidad a 4°C (Figura 7, panel B) durante los 20 días de estudio este se mantuvo entre el 88 y 89%, indicando así, que a esta temperatura el microorganismo es capaz de mantenerse viable. En la temperatura ambiente y 37°C el porcentaje de viabilidad fue de 65% es decir que se perdió más del 10% de viabilidad, siendo no satisfactorias para la conservación de este microorganismo.

Algunos autores reportan, que una recuperación mayor del 90% luego del almacenamiento es buena para considerar la implementación de un método de preservación (Hunter-Cevera y Belt, 1996).

En la figura 8 (paneles A y B) se observa el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* conservada en Buffer Salino Fosfatos pH

7,2. A temperatura de 4°C la población celular disminuyó tres unidades logarítmicas durante los 20 días, mientras que a temperatura ambiente y 37°C disminuyó cuatro unidades logarítmicas, con respecto al recuento inicial el cual fue de  $2.07 \times 10^{11}$  UFC/ml, indicando que a este pH, el proceso de conservación no es el adecuada durante el tiempo de estudio

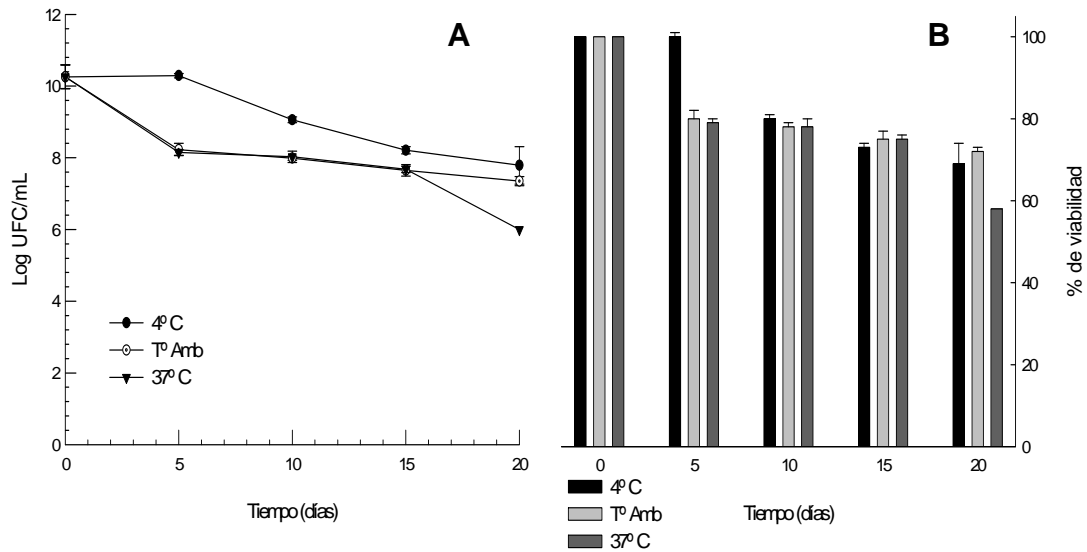


**Figura 8.** Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada en Buffer Salino Fosfatos pH 7,2. (A) Log UFC. (B) % de viabilidad.

En la figura 9 panel A, se observa que en la temperatura de refrigeración la población celular disminuyó dos unidades logarítmicas durante los 20 días de estudio. Mientras que a temperatura ambiente y 37°C se disminuyó la población en tres y cuatro unidades logarítmicas respectivamente, con relación al recuento inicial que fue de  $2.64 \times 10^{10}$  UFC/ml.

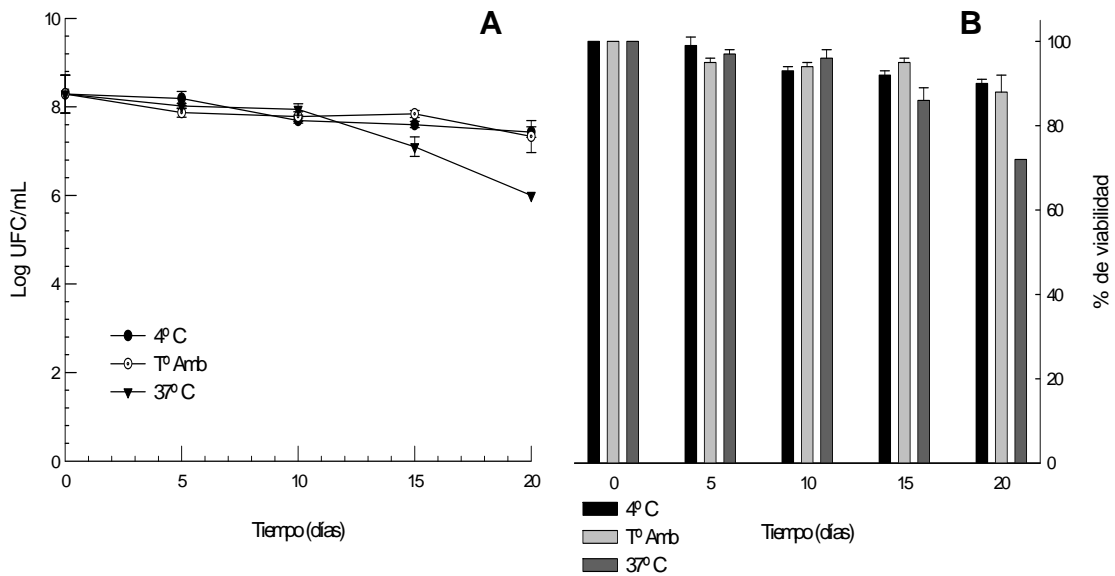
En cuanto al porcentaje de viabilidad, durante los 20 días de estudio, se encontró que a las tres temperaturas se disminuyó la viabilidad de *Escherichia coli* entre el

58% y 72% permitiendo determinar de esta manera que la solución buffer de 7.8 no es el adecuado como método de preservación para la cepa.



**Figura 9.** Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada en Buffer Salino Fosfatos pH 7,8. (A) Log UFC. (B) % de viabilidad

En la figura 10 panel A, se muestra que en el buffer 8.3 a las temperaturas de 4°C y ambiente hubo una disminución de la población celular en una unidad logarítmica, mientras que a temperatura de 37°C, disminuyó en dos unidades logarítmicas con respecto al recuento inicial que fue de  $3.05 \times 10^8$  UFC/ml. En cuanto al porcentaje de viabilidad (panel B), se pudo observar que durante los 20 días de estudio, a las tres temperaturas (4°C, Ambiente y 37°C) disminuyó la viabilidad de *Escherichia coli* en un 90%, 88% y 72% respectivamente



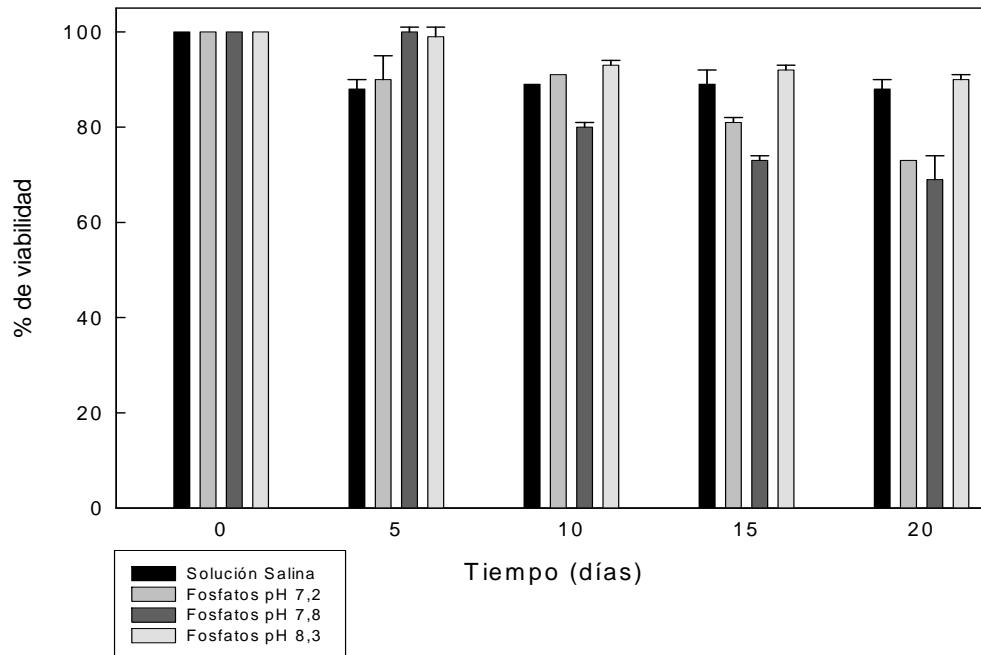
**Figura 10.** Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada en Buffer Salino Fosfatos pH 8,3. (A) Log UFC. (B) % de viabilidad

#### 7.4 Evaluación del efecto de las diferentes soluciones sobre la viabilidad de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 conservadas a las diferentes temperaturas

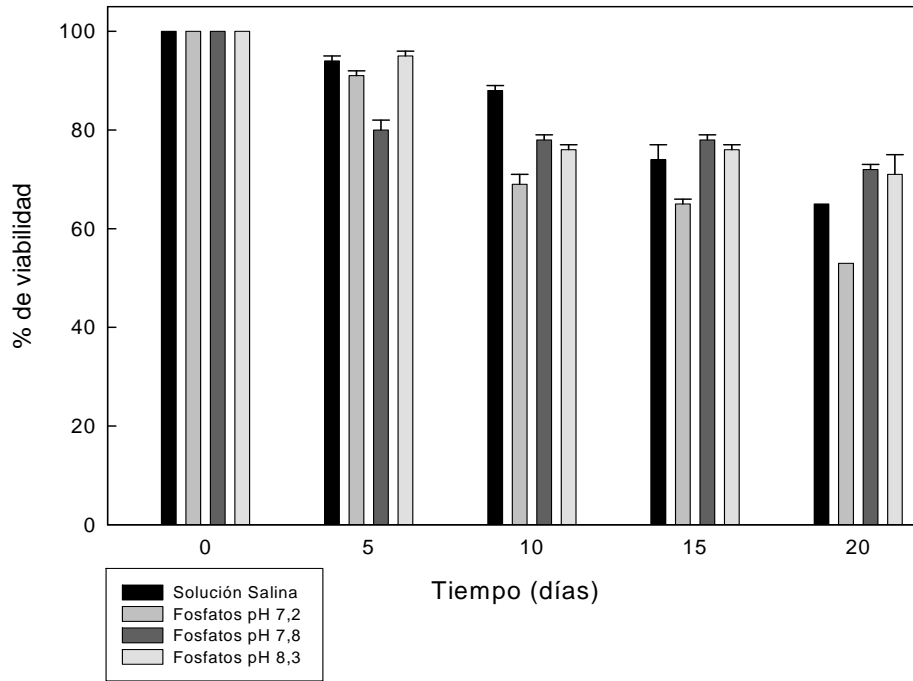
Para este análisis, se realizaron dos tipos de pruebas estadísticas, Tukey y Anova. En la prueba de Tukey (Anexo 6), se observó que a temperatura de almacenamiento de 4°C, el porcentaje de recuperación en solución salina (88%) y el buffer 8.3 (90%) no muestran diferencias significativas, la misma situación se presentó entre el buffer 7.2 y 7.8. Sin embargo, la solución salina y el buffer 8.3 presentan diferencias significativas con respecto a los otros dos buffer a los 20 días (Véase Figura 11).

En la figura 12 se observa que a temperatura ambiente, el porcentaje de recuperación en el buffer 8.3 (88%) muestra una diferencia significativa con respecto a las demás soluciones, solución salina (62%), Buffer 7.2 (53%), Buffer 7.8 (72%). La solución salina presenta diferencias significativas con respecto a los Buffer 7.2, y 7.8, y estos a su vez, presentan diferencias significativas.

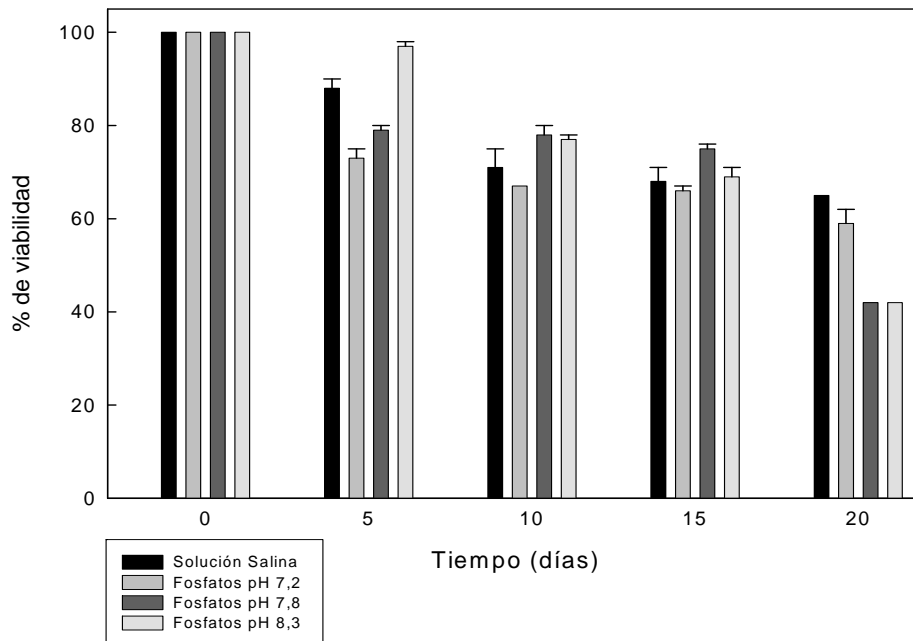
En la figura 13 se observa que a la temperatura de 37°C, el porcentaje de recuperación del buffer 8.3 (72%) fue mayor, evidenciando diferencias significativas con respecto a las demás soluciones. En el Buffer 7.2 y 7.8, el porcentaje de recuperación fue de (59%) y (58%) respectivamente, no mostrando diferencias significativas en los 20 días de estudio.



**Figura 11.** Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada a 4°C



**Figura 12.** Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada a Temperatura Ambiente.



**Figura 13.** Efecto de la solución buffer sobre la viabilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 conservada a 37°C

Para la prueba de Anova se tuvieron en cuenta dos modelos para observar si la densidad poblacional a lo largo de tiempo se ve afectada, es decir si pierden viabilidad. Los dos modelos representan la hipótesis estadística adecuada para el experimento.

El modelo reducido representa la condición de la hipótesis nula sin diferencia entre las medias de los tratamientos, y el modelo completo representa la condición de la hipótesis alterna cuando existen sólo algunas diferencias entre las medias de los tratamientos, determinándose así, cual de los dos modelos caracterizó mejor los datos del experimento. (Ver anexo 7). Observando que no existen diferencias significativas, es decir, los dos modelos describen la viabilidad de *E. coli* y por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ya que las soluciones difieren respecto a la población, almacenados bajo condiciones diferentes.

El buffer 8.3 presentó la menor diferencia cuando se sometieron a diferentes temperaturas (4°C, ambiente, 37°C), lo que significó la menor variabilidad (varianza) durante los 20 días de estudio, es decir la densidad poblacional en estas condiciones presentó la menor variabilidad, posiblemente porque al producirse una nueva situación de estrés osmótico se producen estímulos que pueden ser detectados a través de receptores transmembranales específicos que actúan como sensores de la señal, a nivel de la superficie celular. De esta manera, la composición lipídica de la membrana celular genera modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos. Estas modificaciones en la composición de lípidos polares aportan consistencia a la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura en doble capa lipídica, además la principal estrategia que puede desarrollar *E. coli* se basa en la acumulación masiva de compuestos inorgánicos principalmente  $K^+$  y  $Cl^-$  en el citoplasma, para compensar la presión osmótica del medio externo. El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas (Dennis y Shimmin, 1997).

Por otro lado, se ha reportado que *E. coli* es capaz de responder a los cambios de ambiente alcalino, mediante estrategias de resistencia que incluyen el incremento en la producción de ácidos a través de ácido amino diaminasas y fermentación de azúcares, cambios en las propiedades de la superficie celular e incremento de la expresión y actividad de antiportes catión/protón. Bajo condiciones aerobias incrementa una variedad de proteínas a pH altos, incluyendo proteínas periplásmicas como Ycel, MalE y OmpA, mientras que algunos genes se reprimen como *cyo* y *nuo*. Estas observaciones indican que bajo condiciones alcalinas, se cambia el perfil de la expresión de genes permitiendo una máxima retención y captura de protones por la célula. Dentro de los genes/proteínas involucrados en la homeostasis de pH alcalino se encuentra los antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  descritos por West y Mitchell en células de *E. coli*. Estos antiportes juegan un papel muy importante en el cambio de los genes para la supervivencia y crecimiento a pH alcalino. Por ejemplo el Ec-nhaA confiere en *E. coli* incrementar la capacidad de crecimiento a pH alcalino en presencia de  $\text{Na}^+$ , además de tener propiedades como efectos positivos y negativos en la actividad, relaciones entre estructura-función y mecanismo de reacción (Padan, 2005).

Aunque estos dos mecanismos de respuesta de *E. coli*, frente a estrés osmótico y pH alcalinos, han sido reportados en cultivos, es decir cuando la bacteria está metabólicamente activa, podría inferirse de acuerdo a las condiciones de crecimiento de la bacteria que esta puede encontrarse más o menos adaptada para sobrevivir a estas condiciones. Sin embargo, no hay suficiente información, ni en este ni en otros estudios, para comprobar dicha afirmación, es necesario adelantar investigaciones tendientes a dilucidar los mecanismos por los cuales *E. coli* es capaz de sobrevivir en estos ambientes aun cuando aparentemente no está metabólicamente activa.

### **7.5 Elaboración del protocolo para la producción y formulación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922**

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se elaboró un protocolo siguiendo las normas establecidas en el Instituto Nacional de Salud, el cual se encuentra en el Anexo 8.

## 8. CONCLUSIONES

- Para asegurar la recuperación de células viables, es necesario que el microorganismo se encuentre bajo condiciones que permitan que la pureza permanezca inalterable, además se debe realizar un conteo en placa para garantizar la viabilidad del mismo.
- Con la cinética de crecimiento se estableció, para las condiciones evaluadas, que a la hora ocho se alcanza la mayor producción de células para la conservación del microorganismo.
- Al finalizar el estudio, la viabilidad del microorganismo se mantuvo entre el 53% y el 90%, tanto en la solución salina, como en el buffer 7.2 y el buffer 7.8 a las diferentes temperaturas a las que se sometieron, sin embargo, el Buffer 8.3 mostró un mejor porcentaje de viabilidad del 72% al 90%.
- En el almacenamiento a temperatura de refrigeración se mantuvo un porcentaje de viabilidad entre 69% al 90 % en todas las soluciones, indicando que es la mejor temperatura de conservación
- ♦ La aplicación del protocolo sugerido en este estudio para la conservación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, a corto plazo garantiza la estabilidad y viabilidad de un 72% a un 90% durante 20 días.

## RECOMENDACIONES

- Realizar un banco de trabajo de la cepa *Escherichia coli* con agentes crioprotectantes, como el glicerol para mantener la estabilidad, y viabilidad del microorganismo y tener la posibilidad de usarlo a largo plazo, sin que presente ningún tipo de riesgo en los procesos que se vayan a manejar.
- Tener muestras control de los envíos que realizan a los 182 laboratorios que participan en el programa PICCAP para verificar la calidad de los mismos.
- Hacer conteos en placa para determinar la población exacta a la cual se inicia la concentración celular con el fin de garantizar la viabilidad del microorganismo.
- Utilizar el buffer 8.3 como un método alternativo en los envíos si se quiere obtener una mejor estabilidad del microorganismo.
- Realizar estudios más detallados acerca del comportamiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en buffer fosfatos para poder establecer el tiempo de muerte celular.
- ♦ Se sugiere utilizar estudiar métodos de conservación a largo plazo como la liofilización, para la preparación del material de referencia con miras a obtener resultados óptimos en cuanto a la viabilidad y estabilidad de *Escherichia coli*.

## BIBLIOGRAFIA

- ATKINSON B. 1986. Reactores Bioquímicos. Edt Reverte, S.A. Barcelona España. 19-24 pp.
- BEALES N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Institute of Food Technologists. Vol 3. London. 20pp.
- BELTRAN M. 2003. Ensayos preliminares de estudios controlados del crecimiento bacteriano. Instituto Nacional de Salud Laboratorio de Aguas Salud Ambiental. Bogota. 58pp.
- BERGEY D. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 1. Edt Baltimore. Philadelphia 47-54pp.
- BORREGO J., MORIÑIGO M., DE VICENTE A., CÓRNAX R y ROMERO P. 1987. "Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms". *Water Research*. 21, 1473-1480.
- CARBONELL X, CORCHERO J, CUBARSI R, VILA P y VILLAVERDE A. 2002. Control of *Escherichia coli* growth rate through cell density. *Microbiological Research*. Vol 157, No.4. 257-265pp.
- CASTAÑEDA A. 2003. Diseño y optimización de un sistema continuo para el estudio preliminar de la estabilización del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922 en muestras de referencia para el control de calidad de agua. Instituto Nacional de Salud. Tesis Universidad Javeriana Tunja. 6-11 pp.
- CHING-PING T, CHIN-CHU Y, HSIAO-HSIEN L, CHI-YEN C y JONG-TAR K. 2000. Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of *Escherichia coli* Fumarase (FumA, FumB, and FumC) Activity. *Journal of Bacteriology*. Vol. 183, No. 2. China. 461–467 pp.
- CRUEGER W. 1993. Biotecnología: Manual de microbiología. Edt Acribia, Zaragoza España. 73-117pp.

- DENBIGH K. 1970. Teoría del reactor químico. Edt Alhambra, S.A. Madrid España. 3 -14 pp.
- DENNIS PP y SHIMMIN LC. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*; Vol 61: 90-104 pp.
- DONEVA T y DONEV T. 2004. Anabiosis and conservation of microorganism. *Journal of culture collection*. Vol 4. National bank for industrial microorganism and cells cultures. Sofía Bulgaria. 17-28 pp.
- DORAN P. 1995. Principios de la Ingeniería de los Bioprocesos Edt Acribia, S.A. Zaragoza España. 371 pp.
- FIÑANA I y CEJUDO A. 2000. pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Córdoba. 1-11 pp.
- FLOCARI M. 1998. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Revista Argentina de Microbiología*. 30: 42-51. ISSN 0235-7541. Buenos Aires- Argentina. 38-42pp
- FRANK P y SIMIONE M.2000. Cryopreservation Manual. Nalge Nunc International. 2-15 pp.
- GARCÍA M. 1999. La conservación de las cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 58-69pp.
- GARZON A y GOMEZ J. 2006. Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos. Instituto Nacional de Salud. Tesis Universidad Javeriana. 27-29pp.
- HYUN Y y DOUGLAS M. 2003. Heat Adaptation Alters *Escherichia coli* O157:H7 Membrane Lipid Composition and Verotoxin Production. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, No.9. 5115-5119 pp.
- HUNTER-CEVERA, J.C y BELT A. 1996. Maintaining cultures for Biotechnology and industry. Academy Press. 15-26, 65-82,101-130 pp.
- KELMAN A .1956. Factors influencing viability and variation in cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 16-17pp.

- KIRSOP B y SNELL, J.J S.1984. Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods, Edt Academic press, United States. Orlando Florida, 5-56, 83-130 pp.
- IACOBELIS N.S. y DE VAY J.E. 1986. Long-term storage of plant pathogenic bacteria in sterile distilled water. Applied and Environmental Microbiology. Vol 52 N° 2. 388-389 pp.
- LARSSON JOHAN.2001. High-throughput Fed-batch Production of Affibody® molecules in a novel Multi-fermentor system. Tesis de Master. Linköping University. Suiza.46pp.
- LIAO.C,H y SHOLLENBERGER L.M. 2003. Survivability and long term preservation of bacteria in water and phosphate-buffered saline. Applied Microbiology. Vol 37. 45-50pp.
- MADIGAN M y MARTINKO J. 1999. Brock Biología de los microorganismos. Octava Edición. Edt Prentice Hall. Madrid España. 153-155 pp.
- MARR A. 1991. Growth rate of *Escherichia coli*. Microbiological Reviews 55:316-331pp.
- MERCK E. 1994. Manual de medios de cultivo. Copyright. Alemania.
- MERYMAN H.T. the exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspensions as a cause of freezing injury: The frozen cell. Londres 51-64 pp.
- QUINTERO R. 1987. Ingeniería Bioquímica. Teoría de las aplicaciones. Edt Alhambra Mexicana. México. 30-31 pp.
- RAMÍREZ J y FERRAT G.2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista latinoamericana de Microbiología (ALAM). Vol 47 No 3-4. 92-101 pp.
- SANCHEZ L y CORRALES L. 2005. Congelación Bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Nova-Publicación científica. Facultad de Ciencias de la salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Vol. 3 No 3. 1-5pp.
- SCRAGG A. 2002 Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Edt Limusa. México. 283-314 pp.
- SHRIVER, D.F. 1998. Química Inorgánica. Edt, Reverte. Barcelona España.

15-16 pp.

- SINGLETON P. 2004. Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina, Edt Acibia S.A. Zaragoza España. 55-59 pp.
- Universidad Nacional de Colombia. 2002. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Bogotá.
- VAN ELSAS J.D., y KASTELEIN P. 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. Canadian Journal of Microbiology 842-845 pp.
- WAKIMOTO S y UTATSU I. 1982. Multiplication of *pseudomonas solanacearum* in pure water. Annals of the phytopathological Society of Japan 620-627.
- WENG Z y DIAZ E. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. Revista Cubana Higiene Epidemiológica. Vol. 43 No. 3

# ANEXOS



## ANEXO 1.

### COMPOSICION Y PREPARACION DEL AGAR Y CALDO INFUSION DE CEREBRO-CORAZON. (BHI)

Componente	g/l
Infusión de cerebro.....	12.5 g
Infusión de corazón.....	5 g
Peptona Proteosa.....	10 g
Glucosa.....	2 g
Cloruro de Sodio.....	5 g
Fosfato de Sodio, Monobásico.....	2.5 g
Agar.....	15 g

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

**El caldo BHI consta de los mismos componentes a excepción del agar. y su preparación es la misma.**

#### **Método de preparación:**

- 1) Suspender la cantidad indicada del medio en un litro de agua destilada o Desmineralizada.
  - 2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
  - 3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
- (Merck.1994).

## ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PESO SECO

A continuación se presenta el procedimiento para la elaboración de la curva de peso seco con la cual se transforman los valores de absorbancia obtenidos de la muestra del fermentador a valores de concentración en gramos de masa celular seca por mililitro.

### PROCEDIMIENTO

#### 1. Preparación de la solución *buffer* de fosfatos pH 7,2 - 7,4:

- 1.1. Pesar 6.8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro y 7,1 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro, colocar en un balón aforado de 1000 mL.
- 1.2. Disolver en 100 mL de agua destilada
- 1.3. Completar a 1000mL con agua destilada
- 1.4. Ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con solución de NaOH al 40% ó HCl al 18.5%, según sea el caso
- 1.5. Filtrar por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , en condiciones de esterilidad
- 1.6. Conservar a 4°C hasta el momento de su uso.

#### 2. Preparación de la curva

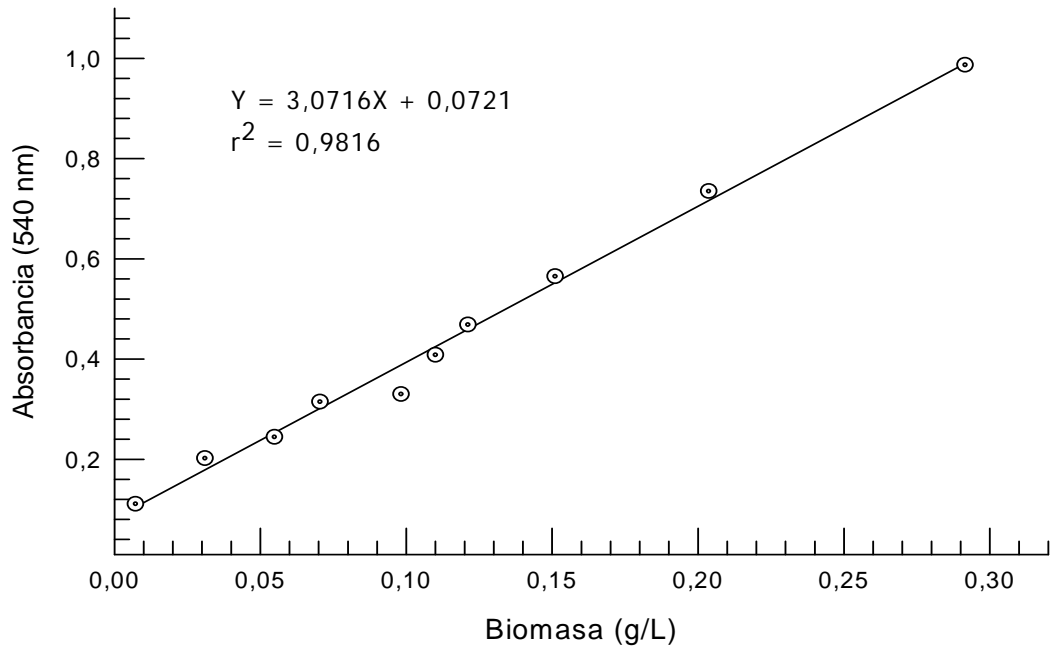
- 2.1. Obtener una suspensión concentrada del microorganismo en *buffer* de fosfatos pH 7,2 - 7,4 (absorbancia 2,5 - 3,0 a 540 nm); por doble lavado a 2250rpm /30 minutos.
- 2.2. Marcar y secar durante 30 horas a 80°C, 20 viales de vidrio de boca angosta con una capacidad de 25 mL.
- 2.3. Pasar los viales secos a un desecador y dejar enfriar durante 3-4 horas.

- 2.4. Pesar los viales en balanza analítica, teniendo siempre la precaución de manipularlos con pinzas limpias, no con la mano.
- 2.5. Transferir 10 mL por vial de la solución de células concentrada a 10 viales secos.
- 2.6. Transferir 10 mL de buffer pH 7,2 - 7,4 por vial a 10 viales secos que sirven de blanco.
- 2.7. Llevar todos los viales a la estufa a 80°C aproximadamente por 20 horas, hasta que el líquido se haya evaporado y no hayan restos de humedad.
- 2.8. Pasar los viales al desecador, esperar a que se enfríen.
- 2.9. Pesar en balanza analítica.

### **3. Construcción de la curva**

- 3.1. Determinar el promedio del peso de los 10 viales que contienen las células y el de los 10 viales que contienen el *buffer*.
- 3.2. Calcular la diferencia de peso entre el promedio de los viales con células y los viales con *buffer*.
- 3.3. Expresar la concentración en gramos de biomasa seca por litro de solución (g biomasa seca/L).
- 3.4. A partir de la solución concentrada se realizarán diluciones con el fin de ajustar lecturas de absorbancia en el rango de 0,2 - 0,8 a 540 nm.
- 3.5. Graficar absorbancia a 540 nm como función de la concentración celular en g biomasa seca/l.

#### 4. Curva de calibración obtenida



### ANEXO 3

#### Composición de los buffer fosfatos a diferentes pH

Ph	Composición
7.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 15.44μM NaCl; 1.55 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;27.09 μM 2.634 x 10 <sup>-10</sup> M
7.8	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 43.5 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 6.5 ml 2.37 x 10 <sup>-10</sup> M
8.3	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 47.35 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2.65 ml 1.592 x10 <sup>-3</sup> M

Fuente; LIAO , 2003.

#### ANEXO 4. TABLA RESULTADOS ENSAYOS FERMENTACION

	1. Fermentación	2. Fermentación	3. Fermentación	Biomasa (g/L)	X/Xo	LN X/Xo
0	0,0431	0,0382	0,0425	0,0413	1	0
0,5	0,11	0,1047	0,0992	0,1046	2,5355	0,9304
1	0,1437	0,1348	0,1273	0,1353	3,2779	1,1872
1,5	0,2094	0,1970	0,1942	0,2002	4,8514	1,5793
2	0,2434	0,2304	0,2273	0,2337	5,6632	1,7340
4	0,4556	0,2657	0,2437	0,3217	7,7948	2,0535
6	0,5345	0,4881	0,5125	0,5113	12,3901	2,5169
8	0,6723	0,6197	0,6274	0,6398	15,5040	2,7411
10	0,7079	0,6692	0,6847	0,6873	16,6543	2,8127
12	0,7156	0,6893	0,7033	0,7027	17,0291	2,8349
14	0,7342	0,7420	0,7466	0,7409	17,9548	2,8879
16	0,7512	0,7481	0,7652	0,7548	18,2916	2,9064
18	0,7683	0,7729	0,7915	0,7776	18,8425	2,9361
20	0,7837	0,7807	0,7946	0,7863	19,0549	2,9473
22	0,7915	0,7930	0,7977	0,7941	19,2423	2,9571

## ANEXO 5. TABLAS ENSAYOS CONSERVACIÓN

ENSAYO No 1. Conservación en Solución Salina a 4°C																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	9,26	9,26	9,26	9,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	7,30E+07	1,50E+08	1,71E+08	2,41E+08	7,86	8,18	8,23	8,38	85%	88%	89%	91%	15%	12%	11%	9%
10	2,03E+08	1,97E+08	1,89E+08	1,72E+08	8,31	8,29	8,28	8,24	90%	90%	89%	89%	10%	10%	11%	11%
15	2,91E+08	2,38E+08	8,50E+07	1,73E+08	8,46	8,38	7,93	8,24	91%	90%	86%	89%	9%	10%	14%	11%
20	1,73E+08	9,60E+07	2,09E+08	1,60E+08	8,24	7,98	8,32	8,20	89%	86%	90%	89%	11%	14%	10%	11%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	1,88E+09	5,31E+08	9,26	0,14	100%	0%	0%	0%
5	1,59E+08	6,91E+07	8,16	0,22	88%	2%	12%	2%
10	1,90E+08	1,35E+07	8,28	0,03	89%	0%	11%	0%
15	1,97E+08	8,88E+07	8,25	0,23	89%	3%	11%	3%
20	1,60E+08	4,71E+07	8,19	0,14	88%	2%	12%	2%

Rto Inicial, Ensayos SS			
2,31E+09	1,88E+09	9,36	9,26
2,09E+09	5,31E+08	9,32	0,14
1,50E+09		9,18	
1,08E+09		9,03	
2,50E+09		9,40	
1,78E+09		9,25	

ENSAYO No 2. Conservación en Solución Salina a T° Ambiente																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	9,26	9,26	9,26	9,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,50E+08	6,20E+08	3,00E+08	5,30E+08	8,65	8,79	8,48	8,72	93%	95%	92%	94%	7%	5%	8%	6%
10	1,75E+08	1,97E+08	1,26E+08	1,05E+08	8,24	8,29	8,10	8,02	89%	90%	88%	87%	11%	10%	12%	13%
15	8,00E+06	3,00E+06	1,20E+07	6,00E+06	6,90	6,48	7,08	6,78	75%	70%	76%	73%	25%	30%	24%	27%
20	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	6,00	6,00	6,00	6,00	65%	65%	65%	65%	35%	35%	35%	35%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	1,88E+09	5,31E+08	9,26	0,14	100%	0%	0%	0%
5	4,75E+08	1,36E+08	8,66	0,14	94%	1%	6%	1%
10	1,51E+08	4,26E+07	8,16	0,13	88%	1%	12%	1%
15	7,25E+06	3,77E+06	6,81	0,25	74%	3%	26%	3%
20	1,00E+06	0,00E+00	6,00	0,00	65%	0%	35%	0%

ENSAYO No 3. Conservación en Solución Salina a 37°C																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	1,88E+09	9,26	9,26	9,26	9,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,08E+08	2,25E+08	1,01E+08	1,70E+08	8,03	8,35	8,00	8,23	87%	90%	86%	89%	13%	10%	14%	11%
10	1,00E+06	6,00E+06	4,00E+06	7,00E+06	6,00	6,78	6,60	6,85	65%	73%	71%	74%	35%	27%	29%	26%
15	3,00E+06	1,00E+06	4,00E+06	1,00E+06	6,48	6,00	6,60	6,00	70%	65%	71%	65%	30%	35%	29%	35%
20	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	6,00	6,00	6,00	6,00	65%	65%	65%	65%	35%	35%	35%	35%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	1,88E+09	5,31E+08	9,26	0,14	100%	0%	0%	0%
5	1,51E+08	5,83E+07	8,16	0,17	88%	2%	12%	2%
10	4,50E+06	2,65E+06	6,56	0,38	71%	4%	29%	4%
15	2,25E+06	1,50E+06	6,27	0,32	68%	3%	32%	3%
20	1,00E+06	0,00E+00	6,00	0,00	65%	0%	35%	0%

ENSAYO No 4. Conservación en Buffer fosfato pH 7,2 a 4°C																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	11,31	11,31	11,31	11,31	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,44E+10	2,94E+10	2,95E+10	2,13E+09	10,39	10,47	10,47	9,33	92%	93%	93%	82%	8%	7%	7%	18%
10	2,36E+10	2,10E+10	2,07E+10	2,29E+10	10,37	10,32	10,32	10,36	92%	91%	91%	92%	8%	9%	9%	8%
15	1,13E+09	1,31E+09	2,31E+09	1,86E+09	9,05	9,12	9,36	9,27	80%	81%	83%	82%	20%	19%	17%	18%
20	1,73E+08	1,66E+08	1,52E+08	1,87E+08	8,24	8,22	8,18	8,27	73%	73%	72%	73%	27%	27%	28%	27%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,07E+11	1,63E+10	11,31	0,03	100%	0%	0%	0%
5	2,14E+10	1,30E+10	10,16	0,56	90%	5%	10%	5%
10	2,21E+10	1,42E+09	10,34	0,03	91%	0%	9%	0%
15	1,65E+09	5,37E+08	9,20	0,14	81%	1%	19%	1%
20	1,70E+08	1,46E+07	8,23	0,04	73%	0%	27%	0%

Rto Inicial, Ensayos pH 7,2			
1,92E+11	2,07E+11	11,28	11,31
2,28E+11	1,63E+10	11,36	0,03
2,15E+11		11,33	
1,84E+11		11,26	
2,15E+11		11,33	
2,08E+11		11,32	

<b>ENSAYO No 5. Conservación en Buffer fosfato pH 7,2 a T° Ambiente</b>																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	11,31	11,31	11,31	11,31	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,23E+10	1,89E+10	2,47E+10	1,90E+10	10,35	10,28	10,39	10,28	91%	91%	92%	91%	9%	9%	8%	9%
10	8,20E+07	3,20E+07	7,90E+07	6,50E+07	7,91	7,51	7,90	7,81	70%	66%	70%	69%	30%	34%	30%	31%
15	1,90E+07	2,40E+07	3,00E+07	3,10E+07	7,28	7,38	7,48	7,49	64%	65%	66%	66%	36%	35%	34%	34%
20	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	6,00	6,00	6,00	6,00	53%	53%	53%	53%	47%	47%	47%	47%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,07E+11	1,63E+10	11,31	0,03	100%	0%	0%	0%
5	2,12E+10	2,80E+09	10,32	0,06	91%	1%	9%	1%
10	6,45E+07	2,29E+07	7,78	0,19	69%	2%	31%	2%
15	2,60E+07	5,60E+06	7,41	0,10	65%	1%	35%	1%
20	1,00E+06	0,00E+00	6,00	0,00	53%	0%	47%	0%

<b>ENSAYO No 6. Conservación en Buffer fosfato pH 7,2 a 37°C</b>																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	2,07E+11	11,31	11,31	11,31	11,31	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,09E+08	1,20E+08	2,39E+08	2,96E+08	8,04	8,08	8,38	8,47	71%	71%	74%	75%	29%	29%	26%	25%
10	3,60E+07	3,90E+07	4,20E+07	4,10E+07	7,56	7,59	7,62	7,61	67%	67%	67%	67%	33%	33%	33%	33%
15	3,20E+07	1,90E+07	3,10E+07	3,00E+07	7,51	7,28	7,49	7,48	66%	64%	66%	66%	34%	36%	34%	34%
20	8,00E+06	1,10E+07	3,00E+06	2,00E+06	6,90	7,04	6,48	6,30	61%	62%	57%	56%	39%	38%	43%	44%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,07E+11	1,63E+10	11,31	0,03	100%	0%	0%	0%
5	1,91E+08	9,15E+07	8,24	0,22	73%	2%	27%	2%
10	3,95E+07	2,65E+06	7,60	0,03	67%	0%	33%	0%
15	2,80E+07	6,06E+06	7,44	0,11	66%	1%	34%	1%
20	6,00E+06	4,24E+06	6,68	0,35	59%	3%	41%	3%

<b>ENSAYO No 7. Conservación en Buffer fosfato pH 7,8 a 4°C</b>																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	10,26	10,26	10,26	10,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,92E+10	1,62E+10	2,24E+10	2,10E+10	10,28	10,21	10,35	10,32	100%	100%	101%	101%	0%	0%	-1%	-1%
10	1,42E+09	1,22E+09	1,02E+09	9,50E+08	9,15	9,09	9,01	8,98	81%	80%	80%	79%	19%	20%	20%	21%
15	1,33E+08	1,43E+08	2,20E+08	1,67E+08	8,12	8,16	8,34	8,22	72%	72%	74%	73%	28%	28%	26%	27%
20	1,22E+08	1,06E+08	1,06E+08	1,04E+07	8,09	8,03	8,03	7,02	71%	71%	71%	62%	29%	29%	29%	38%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,46E+10	2,64E+10	10,26	0,33	100%	0%	0%	0%
5	1,97E+10	2,68E+09	10,29	0,06	100%	1%	0%	1%
10	1,15E+09	2,12E+08	9,06	0,08	80%	1%	20%	1%
15	1,66E+08	3,89E+07	8,21	0,10	73%	1%	27%	1%
20	8,61E+07	5,10E+07	7,79	0,52	69%	5%	31%	5%

<b>Rto Inicial, Ensayos pH 7,8</b>			
1,03E+10	2,46E+10	10,01	10,26
7,80E+10	2,64E+10	10,89	0,33
1,16E+10		10,06	
1,21E+10		10,08	
1,84E+10		10,26	
1,72E+10		10,24	

ENSAYO No 8. Conservación en Buffer fosfato pH 7,8 a T° Ambiente																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	10,26	10,26	10,26	10,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,21E+08	1,14E+08	2,60E+08	1,29E+08	8,34	8,06	8,41	8,11	81%	79%	82%	79%	19%	21%	18%	21%
10	9,50E+07	1,10E+08	8,10E+07	1,07E+08	7,98	8,04	7,91	8,03	78%	78%	77%	78%	22%	22%	23%	22%
15	7,10E+07	5,20E+07	3,70E+07	3,00E+07	7,85	7,72	7,57	7,48	77%	75%	74%	73%	23%	25%	26%	27%
20	2,90E+07	1,50E+07	2,30E+07	2,60E+07	7,46	7,18	7,36	7,41	73%	70%	72%	72%	27%	30%	28%	28%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,46E+10	2,64E+10	10,26	0,33	100%	0%	0%	0%
5	1,81E+08	7,08E+07	8,23	0,17	80%	2%	20%	2%
10	9,83E+07	1,32E+07	7,99	0,06	78%	1%	22%	1%
15	4,75E+07	1,82E+07	7,65	0,16	75%	2%	25%	2%
20	2,33E+07	6,02E+06	7,35	0,13	72%	1%	28%	1%

ENSAYO No 9. Conservación en Buffer fosfato pH 7,8 a 37°C																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	2,46E+10	10,26	10,26	10,26	10,26	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,74E+08	1,10E+08	1,53E+08	1,39E+08	8,24	8,04	8,18	8,14	80%	78%	80%	79%	20%	22%	20%	21%
10	1,20E+08	6,20E+07	1,40E+08	1,27E+08	8,08	7,79	8,15	8,10	79%	76%	79%	79%	21%	24%	21%	21%
15	4,80E+07	6,30E+07	3,90E+07	4,60E+07	7,68	7,80	7,59	7,66	75%	76%	74%	75%	25%	24%	26%	25%
20	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	6,00	6,00	6,00	6,00	58%	58%	58%	58%	42%	42%	42%	42%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	2,46E+10	2,64E+10	10,26	0,33	100%	0%	0%	0%
5	1,44E+08	2,68E+07	8,15	0,08	79%	1%	21%	1%
10	1,12E+08	3,45E+07	8,03	0,16	78%	2%	22%	2%
15	4,90E+07	1,01E+07	7,68	0,09	75%	1%	25%	1%
20	1,00E+06	0,00E+00	6,00	0,00	58%	0%	42%	0%

**ENSAYO No 10. Conservación en Buffer fosfato pH 8,3 a 4°C**

Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	8,29	8,29	8,29	8,29	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,57E+08	1,55E+08	1,29E+08	1,13E+08	8,41	8,19	8,11	8,05	101%	99%	98%	97%	-1%	1%	2%	3%
10	5,60E+07	4,30E+07	4,40E+07	5,40E+07	7,75	7,63	7,64	7,73	93%	92%	92%	93%	7%	8%	8%	7%
15	4,90E+07	4,10E+07	3,50E+07	3,60E+07	7,69	7,61	7,54	7,56	93%	92%	91%	91%	7%	8%	9%	9%
20	3,00E+07	1,80E+07	3,00E+07	3,20E+07	7,48	7,26	7,48	7,51	90%	88%	90%	91%	10%	12%	10%	9%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	3,05E+08	3,19E+08	8,29	0,43	100%	0%	0%	0%
5	1,64E+08	6,47E+07	8,19	0,16	99%	2%	1%	2%
10	4,93E+07	6,70E+06	7,69	0,06	93%	1%	7%	1%
15	4,03E+07	6,40E+06	7,60	0,07	92%	1%	8%	1%
20	2,75E+07	6,40E+06	7,43	0,12	90%	1%	10%	1%

Rto Inicial, Ensayos pH 8,3			
1,25E+08	3,05E+08	8,10	8,29
1,02E+08	3,19E+08	8,01	0,43
1,05E+08		8,02	
8,20E+08		8,91	
8,60E+07		7,93	
5,90E+08		8,77	

ENSAYO No 11. Conservación en Buffer fosfato pH 8,3 a T° Ambiente																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	8,29	8,29	8,29	8,29	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	8,20E+07	5,40E+07	7,30E+07	9,40E+07	7,91	7,73	7,86	7,97	95%	93%	95%	96%	5%	7%	5%	4%
10	7,10E+07	4,20E+07	6,80E+07	6,70E+07	7,85	7,62	7,83	7,83	95%	92%	94%	94%	5%	8%	6%	6%
15	7,90E+07	5,40E+07	8,20E+07	6,40E+07	7,90	7,73	7,91	7,81	95%	93%	95%	94%	5%	7%	5%	6%
20	7,00E+06	1,80E+07	4,20E+07	3,80E+07	6,85	7,26	7,62	7,58	83%	88%	92%	91%	17%	12%	8%	9%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	3,05E+08	3,19E+08	8,29	0,43	100%	0%	0%	0%
5	7,58E+07	1,69E+07	7,87	0,10	95%	1%	5%	1%
10	6,20E+07	1,34E+07	7,78	0,11	94%	1%	6%	1%
15	6,98E+07	1,31E+07	7,84	0,08	95%	1%	5%	1%
20	2,63E+07	1,66E+07	7,33	0,36	88%	4%	12%	4%

ENSAYO No 12. Conservación en Buffer fosfato pH 8,3 a 37°C																
Tiempo (días)	UFC/mL				Log UFC/mL				% de viabilidad				% de pérdida			
	Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2		Vial 1		Vial 2	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	3,05E+08	8,29	8,29	8,29	8,29	100%	100%	100%	100%	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,08E+08	1,15E+08	8,50E+07	1,10E+08	8,03	8,06	7,93	8,04	97%	97%	96%	97%	3%	3%	4%	3%
10	6,10E+07	1,24E+08	8,90E+07	8,40E+07	7,79	8,09	7,95	7,92	94%	98%	96%	96%	6%	2%	4%	4%
15	7,00E+06	1,30E+07	1,20E+07	2,40E+07	6,85	7,11	7,08	7,38	83%	86%	85%	89%	17%	14%	15%	11%
20	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	6,00	6,00	6,00	6,00	72%	72%	72%	72%	28%	28%	28%	28%

Tiempo (días)	UFC/mL		Log UFC/mL		% de viabilidad		% de pérdida	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	3,05E+08	3,19E+08	8,29	0,43	100%	0%	0%	0%
5	1,05E+08	1,33E+07	8,02	0,06	97%	1%	3%	1%
10	8,95E+07	2,60E+07	7,94	0,13	96%	2%	4%	2%
15	1,40E+07	7,16E+06	7,10	0,22	86%	3%	14%	3%
20	1,00E+06	0,00E+00	6,00	0,00	72%	0%	28%	0%

## ANEXO 6. PRUEBAS ESTADÍSTICAS TUKEY

### Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D5	1,00	2,00	-,05331*	,01423	,024
		3,00	,00092	,01423	1,000
		4,00	-,01635	,01423	,990
		5,00	,03054	,01423	,596
		6,00	,15350*	,01423	,000
		7,00	-,12128*	,01423	,000
		8,00	,07948*	,01423	,000
		9,00	,08721*	,01423	,000
		10,00	-,10605*	,01423	,000
		11,00	-,06741*	,01423	,002
		12,00	-,08437*	,01423	,000
		2,00	1,00	,05331*	,01423
	3,00		,05473*	,01423	,020
	4,00		,03746	,01423	,300
	5,00		,02327	,01423	,885
	6,00		,20732*	,01423	,000
	7,00		-,06747*	,01423	,002
	8,00		,13329*	,01423	,000
	9,00		,11102*	,01423	,000
	10,00		-,05224*	,01423	,032
	11,00		-,01330	,01423	,990
	12,00		-,03116	,01423	,567
	3,00		1,00	-,00092	,01423
		2,00	-,05473*	,01423	,020
		4,00	-,01727	,01423	,984
		5,00	-,03146	,01423	,553
		6,00	,15258*	,01423	,000
		7,00	-,12220*	,01423	,000
		8,00	,07856*	,01423	,000
		9,00	,08629*	,01423	,000
		10,00	-,10697*	,01423	,000
		11,00	-,06833*	,01423	,001
		12,00	-,08539*	,01423	,000
		4,00	1,00	,01635	,01423
	2,00		-,03746	,01423	,300
	3,00		,01727	,01423	,984
	5,00		-,01419	,01423	,997
	6,00		,16936*	,01423	,000
	7,00		-,10493*	,01423	,000
	8,00		,09534*	,01423	,000
	9,00		,10357*	,01423	,000
	10,00		-,08970*	,01423	,000
	11,00		-,05106*	,01423	,039
	12,00		-,06862*	,01423	,001

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D5	5,00	1,00	,03054	,01423	,596
		2,00	-,02327	,01423	,885
		3,00	,03146	,01423	,553
		4,00	,01419	,01423	,997
		6,00	,18405*	,01423	,000
		7,00	-,09074*	,01423	,000
		8,00	,11003*	,01423	,000
		9,00	,11776*	,01423	,000
		10,00	-,07550*	,01423	,000
		11,00	-,03687	,01423	,322
		12,00	-,05443*	,01423	,022
		6,00	1,00	-,15350*	,01423
	2,00		-,20732*	,01423	,000
	3,00		-,15258*	,01423	,000
	4,00		-,16986*	,01423	,000
	5,00		-,18405*	,01423	,000
	7,00		-,27479*	,01423	,000
	8,00		-,07402*	,01423	,000
	9,00		-,06629*	,01423	,002
	10,00		-,25955*	,01423	,000
	11,00		-,22092*	,01423	,000
	12,00		-,23848*	,01423	,000
	7,00		1,00	,12128*	,01423
		2,00	,06747*	,01423	,002
		3,00	,12220*	,01423	,000
		4,00	,10493*	,01423	,000
		5,00	,09074*	,01423	,000
		6,00	,27479*	,01423	,000
		8,00	,20077*	,01423	,000
		9,00	,20850*	,01423	,000
		10,00	,01524	,01423	,994
		11,00	,05387*	,01423	,024
		12,00	,03631	,01423	,343
		8,00	1,00	-,07948*	,01423
	2,00		-,13329*	,01423	,000
	3,00		-,07856*	,01423	,000
4,00	-,09584*		,01423	,000	
5,00	-,11003*		,01423	,000	
6,00	,07402*		,01423	,000	
7,00	-,20077*		,01423	,000	
9,00	,00773		,01423	1,000	
10,00	,18553*		,01423	,000	
11,00	-,14690*		,01423	,000	
12,00	-,16445*		,01423	,000	

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIFENTO	(J) TRATAMIFENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D10	1,00	2,00	,01229	,01118	,993
		3,00	,18604*	,01118	,000
		4,00	-,01979	,01118	,823
		5,00	,20650*	,01118	,000
		6,00	,22298*	,01118	,000
		7,00	,09391*	,01118	,000
		8,00	,11553*	,01118	,000
		9,00	,11152*	,01118	,000
		10,00	-,03314	,01118	,162
		11,00	-,04446*	,01118	,014
		12,00	-,06314*	,01118	,000
		2,00	1,00	-,01229	,01118
	3,00		,17375*	,01118	,000
	4,00		-,03207	,01118	,195
	5,00		,19421*	,01118	,000
	6,00		,21070*	,01118	,000
	7,00		,08163*	,01118	,000
	8,00		,10324*	,01118	,000
	9,00		,09923*	,01118	,000
	10,00		-,04542*	,01118	,012
	11,00		-,05675*	,01118	,001
	12,00		-,07542*	,01118	,000
	3,00		1,00	-,18604*	,01118
		2,00	-,17375*	,01118	,000
		4,00	-,20583*	,01118	,000
		5,00	,02046	,01118	,791
		6,00	,03694	,01118	,077
		7,00	-,09213*	,01118	,000
		8,00	-,07051*	,01110	,000
		9,00	-,07452*	,01118	,000
		10,00	-,21918*	,01118	,000
		11,00	-,23050*	,01118	,000
		12,00	-,24918*	,01118	,000
		4,00	1,00	,01979	,01118
	2,00		,03207	,01118	,195
	3,00		,20583*	,01118	,000
	5,00		,22628*	,01118	,000
	6,00		,24277*	,01118	,000
	7,00		,11370*	,01118	,000
	8,00		,13531*	,01118	,000
	9,00		,13130*	,01118	,000
	10,00		-,01335	,01118	,986
	11,00		-,02468	,01118	,555
	12,00		-,04335*	,01118	,019

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D10	5,00	1,00	-,20650*	,01118	,000
		2,00	-,19421*	,01118	,000
		3,00	-,02046	,01118	,791
		4,00	-,22628*	,01118	,000
		6,00	,01649	,01118	,938
		7,00	-,11258*	,01118	,000
		8,00	-,09097*	,01118	,000
		9,00	-,09498*	,01118	,000
		10,00	-,23964*	,01118	,000
		11,00	-,25096*	,01118	,000
		12,00	-,26964*	,01118	,000
		6,00	1,00	-,22298*	,01118
	2,00		-,21070*	,01118	,000
	3,00		-,03694	,01118	,077
	4,00		-,24277*	,01118	,000
	5,00		-,01649	,01118	,938
	7,00		-,12907*	,01118	,000
	8,00		-,10746*	,01118	,000
	9,00		-,11146*	,01118	,000
	10,00		-,25612*	,01118	,000
	11,00		-,26745*	,01118	,000
	12,00		-,28612*	,01118	,000
	7,00		1,00	-,09391*	,01118
		2,00	-,08163*	,01118	,000
		3,00	,09213*	,01118	,000
		4,00	-,11370*	,01118	,000
		5,00	,11258*	,01118	,000
		6,00	,12907*	,01118	,000
		8,00	,02161	,01118	,732
		9,00	,01760	,01118	,907
		10,00	-,12705*	,01118	,000
		11,00	-,13838*	,01118	,000
		12,00	-,15705*	,01118	,000
		8,00	1,00	-,11553*	,01118
	2,00		-,10324*	,01118	,000
	3,00		,07051*	,01118	,000
	4,00		-,13531*	,01118	,000
	5,00		,09097*	,01118	,000
	6,00		,10746*	,01118	,000
	7,00		-,02161	,01118	,732
	9,00		-,00401	,01118	1,000
	10,00		-,14867*	,01118	,000
	11,00		-,15999*	,01118	,000
	12,00		-,17867*	,01118	,000

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
D10	9,00	1,00	-,11152*	,01118	,000	
		2,00	-,09923*	,01118	,000	
		3,00	,07452*	,01118	,000	
		4,00	-,13130*	,01118	,000	
		5,00	,09498*	,01118	,000	
		6,00	,11146*	,01118	,000	
		7,00	-,01760	,01118	,907	
		8,00	,00401	,01118	1,000	
		10,00	-,14466*	,01118	,000	
		11,00	-,15598*	,01118	,000	
		12,00	-,17466*	,01118	,000	
		10,00	1,00	2,00	,03314	,01118
	3,00			,04542*	,01118	,012
	4,00			,21918*	,01118	,000
	5,00			,01335	,01118	,986
	6,00			,23964*	,01118	,000
	7,00			,25612*	,01118	,000
	8,00			,12705*	,01118	,000
	9,00			,14867*	,01118	,000
	10,00			,14466*	,01118	,000
	11,00			-,01133	,01118	,996
	12,00			-,03000	,01118	,275
	11,00			1,00	2,00	,04446*
		3,00	,05675*		,01118	,001
		4,00	,23050*		,01118	,000
		5,00	,02468		,01118	,555
		6,00	,25096*		,01118	,000
		7,00	,26745*		,01118	,000
		8,00	,13838*		,01118	,000
		9,00	,15999*		,01118	,000
		10,00	,15598*		,01118	,000
		11,00	,01133		,01118	,996
		12,00	-,01867		,01118	,870
		12,00	1,00		2,00	,06314*
	3,00			,07542*	,01118	,000
	4,00			,24918*	,01118	,000
5,00	,04335*			,01118	,019	
6,00	,26964*			,01118	,000	
7,00	,28612*			,01118	,000	
8,00	,15705*			,01118	,000	
9,00	,17867*			,01118	,000	
10,00	,17466*			,01118	,000	
11,00	,03000			,01118	,275	
12,00	,01867			,01118	,870	

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D15	1,00	2,00	,15584*	,01314	,000
		3,00	,21413*	,01314	,000
		4,00	,07827*	,01314	,000
		5,00	,23682*	,01314	,000
		6,00	,23406*	,01314	,000
		7,00	,16575*	,01314	,000
		8,00	,14543*	,01314	,000
		9,00	,14246*	,01314	,000
		10,00	-,02532	,01314	,736
		11,00	-,05387*	,01314	,010
		12,00	,03453	,01314	,302
		2,00	1,00	-,15584*	,01314
	3,00		,05829*	,01314	,004
	4,00		-,07757*	,01314	,000
	5,00		,08098*	,01314	,000
	6,00		,07822*	,01314	,000
	7,00		,00991	,01314	1,000
	8,00		-,01041	,01314	1,000
	9,00		-,01338	,01314	,996
	10,00		-,18116*	,01314	,000
	11,00		-,20971*	,01314	,000
	12,00		-,12131*	,01314	,000
	3,00		1,00	-,21413*	,01314
		2,00	-,05829*	,01314	,004
		4,00	-,13586*	,01314	,000
		5,00	,02269	,01314	,844
		6,00	,01993	,01314	,926
		7,00	-,04838*	,01314	,031
		8,00	-,06870*	,01314	,000
		9,00	-,07167*	,01314	,000
		10,00	-,23945*	,01314	,000
		11,00	-,26800*	,01314	,000
		12,00	-,17960*	,01314	,000
		4,00	1,00	-,07827*	,01314
	2,00		,07757*	,01314	,000
	3,00		,13586*	,01314	,000
	5,00		,15855*	,01314	,000
	6,00		,15579*	,01314	,000
	7,00		,08748*	,01314	,000
	8,00		,06716*	,01314	,001
	9,00		,06419*	,01314	,001
	10,00		-,10359*	,01314	,000
	11,00		-,13214*	,01314	,000
	12,00		-,04374	,01314	,073

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D15	5,00	1,00	-,23682*	,01314	,000
		2,00	-,08098*	,01314	,000
		3,00	-,02269	,01314	,844
		4,00	-,15855*	,01314	,000
		6,00	-,00276	,01314	1,000
		7,00	-,07108*	,01314	,000
		8,00	-,09140*	,01314	,000
		9,00	-,09436*	,01314	,000
		10,00	-,26214*	,01314	,000
		11,00	-,29069*	,01314	,000
		12,00	-,20229*	,01314	,000
		6,00	1,00	-,23406*	,01314
	2,00		-,07822*	,01314	,000
	3,00		-,01993	,01314	,926
	4,00		-,15579*	,01314	,000
	5,00		,00276	,01314	1,000
	7,00		-,06832*	,01314	,000
	8,00		-,08864*	,01314	,000
	9,00		-,09160*	,01314	,000
	10,00		-,25938*	,01314	,000
	11,00		-,28793*	,01314	,000
	12,00		-,19953*	,01314	,000
	7,00		1,00	-,16575*	,01314
		2,00	-,00991	,01314	1,000
		3,00	,04838*	,01314	,031
		4,00	-,08748*	,01314	,000
		5,00	,07108*	,01314	,000
		6,00	,06832*	,01314	,000
		8,00	-,02032	,01314	,917
		9,00	-,02329	,01314	,822
		10,00	-,19107*	,01314	,000
		11,00	-,21961*	,01314	,000
		12,00	-,13122*	,01314	,000
		8,00	1,00	-,14543*	,01314
	2,00		,01041	,01314	1,000
	3,00		,06870*	,01314	,000
4,00	-,06716*		,01314	,001	
5,00	,09140*		,01314	,000	
6,00	,08864*		,01314	,000	
7,00	,02032		,01314	,917	
9,00	-,00297		,01314	1,000	
10,00	-,17075*		,01314	,000	
11,00	-,19929*		,01314	,000	
12,00	-,11090*		,01314	,000	

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
D15	9,00	1,00	-,14246*	,01314	,000	
		2,00	,01338	,01314	,996	
		3,00	,07167*	,01314	,000	
		4,00	-,06419*	,01314	,001	
		5,00	,09436*	,01314	,000	
		6,00	,09160*	,01314	,000	
		7,00	,02329	,01314	,822	
		8,00	,00297	,01314	1,000	
		10,00	-,16778*	,01314	,000	
		11,00	-,19633*	,01314	,000	
		12,00	-,10793*	,01314	,000	
		10,00	1,00	2,00	,02532	,01314
	3,00			,18116*	,01314	,000
	4,00			,23945*	,01314	,000
	5,00			,10359*	,01314	,000
	6,00			,26214*	,01314	,000
	7,00			,25938*	,01314	,000
	8,00			,19107*	,01314	,000
	9,00			,17075*	,01314	,000
	11,00			,16778*	,01314	,000
	12,00			-,02855	,01314	,578
	12,00			,05985*	,01314	,003
	11,00			1,00	2,00	,05387*
		3,00	,20971*		,01314	,000
		4,00	,26800*		,01314	,000
		5,00	,13214*		,01314	,000
		6,00	,29069*		,01314	,000
		7,00	,28793*		,01314	,000
		8,00	,21961*		,01314	,000
		9,00	,19929*		,01314	,000
		10,00	,19633*		,01314	,000
		12,00	,02855		,01314	,578
		12,00	,08840*		,01314	,000
		12,00	1,00		2,00	-,03453
	3,00			,12131*	,01314	,000
	4,00			,17960*	,01314	,000
	5,00			,04374	,01314	,073
	6,00			,20229*	,01314	,000
	7,00			,19953*	,01314	,000
	8,00			,13122*	,01314	,000
	9,00			,11090*	,01314	,000
	10,00			,10793*	,01314	,000
	11,00			-,05985*	,01314	,003
	11,00			-,08840*	,01314	,000

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
D20	1,00	2,00	,23616*	,01515	,000
		3,00	,23616*	,01515	,000
		4,00	,15714*	,01515	,000
		5,00	,35405*	,01515	,000
		6,00	,29389*	,01515	,000
		7,00	,19598*	,01515	,000
		8,00	,16749*	,01515	,000
		9,00	,29946*	,01515	,000
		10,00	-,01167	,01515	1,000
		11,00	,00073	,01515	1,000
		12,00	,16065*	,01515	,000
		2,00	1,00	-,23616*	,01515
	3,00		,00000	,01515	1,000
	4,00		-,07902*	,01515	,000
	5,00		,11789*	,01515	,000
	6,00		,05773*	,01515	,022
	7,00		-,04018	,01515	,290
	8,00		-,06867*	,01515	,003
	9,00		,06330*	,01515	,008
	10,00		-,24783*	,01515	,000
	11,00		-,23543*	,01515	,000
	12,00		-,07552*	,01515	,001
	3,00		1,00	-,23616*	,01515
		2,00	,00000	,01515	1,000
		4,00	-,07902*	,01515	,000
		5,00	,11789*	,01515	,000
		6,00	,05773*	,01515	,022
		7,00	-,04018	,01515	,290
		8,00	-,06867*	,01515	,003
		9,00	,06330*	,01515	,008
		10,00	-,24783*	,01515	,000
		11,00	-,23543*	,01515	,000
		12,00	-,07552*	,01515	,001
		4,00	1,00	-,15714*	,01515
	2,00		,07902*	,01515	,000
	3,00		,07902*	,01515	,000
	5,00		,19691*	,01515	,000
	6,00		,13675*	,01515	,000
	7,00		,03884	,01515	,336
	8,00		,01035	,01515	1,000
	9,00		,14232*	,01515	,000
	10,00		-,16881*	,01515	,000
	11,00		-,15641*	,01515	,000
	12,00		,00351	,01515	1,000

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
D20	9,00	1,00	-,29946*	,01515	,000	
		2,00	-,06330*	,01515	,008	
		3,00	-,06330*	,01515	,008	
		4,00	-,14232*	,01515	,000	
		5,00	,05459*	,01515	,038	
		6,00	-,00557	,01515	1,000	
		7,00	-,10348*	,01515	,000	
		8,00	-,13197*	,01515	,000	
		10,00	-,31113*	,01515	,000	
		11,00	-,29873*	,01515	,000	
		12,00	-,13881*	,01515	,000	
		10,00	1,00	2,00	,01167	,01515
	3,00			,24783*	,01515	,000
	4,00			,24783*	,01515	,000
	5,00			,16881*	,01515	,000
	6,00			,36572*	,01515	,000
	7,00			,30556*	,01515	,000
	8,00			,20765*	,01515	,000
	9,00			,17916*	,01515	,000
	11,00			,31113*	,01515	,000
	12,00			,01240	,01515	,999
	12,00			,17232*	,01515	,000
	11,00			1,00	2,00	-,00073
		3,00	,23543*		,01515	,000
		4,00	,23543*		,01515	,000
		5,00	,15641*		,01515	,000
		6,00	,35332*		,01515	,000
		7,00	,29316*		,01515	,000
		8,00	,19525*		,01515	,000
		9,00	,16676*		,01515	,000
		10,00	,29873*		,01515	,000
		12,00	-,01240		,01515	,999
		12,00	,15991*		,01515	,000
		12,00	1,00		2,00	-,16065*
	3,00			,07552*	,01515	,001
	4,00			,07552*	,01515	,001
5,00	-,00351			,01515	1,000	
6,00	,19340*			,01515	,000	
7,00	,13324*			,01515	,000	
8,00	,03533			,01515	,474	
9,00	,00685			,01515	1,000	
10,00	,13881*			,01515	,000	
11,00	-,17232*			,01515	,000	
11,00	-,15991*			,01515	,000	

ANEXO 7. MODELOS ESTADÍSTICOS SEGÚN ANOVA

TRATAMIENTO			MODELO REDUCIDO	MODELO COMPLETO	DIFERENCIA	
TEMPERATURA (°C)			MEDIO	SCE <sub>r</sub>	SCE <sub>s</sub>	SCE <sub>r</sub> - SCE <sub>s</sub>
4	Ambiente	37	PH 7.8	23.01	19.75	3.26
4	Ambiente	37	PH 7.2	44.76	37.61	7.15
4	Ambiente	37	PH 8.3	4.96	4.52	0.44
4	Ambiente	37	SOLUCION SALINA	19.44	15.95	3.49

**ANEXO 8. PROTOCOLO PARA LA CONSERVACION A CORTO PLAZO DE  
LA CEPA *Escherichia coli* ATCC 25922**

**TABLA DE CONTENIDO**

1. OBJETIVO
2. ALCANCE

3. RESPONSABILIDAD
4. FRECUENCIA
5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA
6. CONTENIDO

FUNDAMENTO

DEFINICIONES

EQUIPOS

MATERIALES Y REACTIVOS

PROCEDIMIENTO

## **1. OBJETIVO**

Suministrar la información correspondiente para llevar a cabo la producción y conservación a corto plazo de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada como material de referencia en el programa PICCAP.

## **2. ALCANCE**

Este documento se tomará como referencia única para realizar la producción y conservación a corto plazo de la cepa *Escherichia coli* ATCC.

## **3. RESPONSABILIDAD**

El profesional es responsable de ejecutar adecuadamente las instrucciones aquí explicadas.

## **4. FRECUENCIA**

El presente documento se deberá aplicar cada vez que sea necesario.

## **5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA**

GARCÍA, MARÍA DOLORES. 1999. La conservación de las cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 58-69pp.

WENG, Z; DIAZ, E. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. Revista Cubana Higiene Epidemiológica. Vol. 43 No. 3

## 6. CONTENIDO

### 6.1 FUNDAMENTO

*Escherichia coli* es un microorganismo que se encuentra dentro del grupo de los aerobios facultativos ya que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, durante la fase estacionaria, aunque no se produce un aumento neto de la masa del cultivo la composición celular cambia cuando el cultivo pasa a esta fase. Las células se hacen más pequeñas y comienzan a sintetizar componentes que les ayudan a sobrevivir, sin crecer, durante largos períodos de tiempo.

### 6.2 DEFINICIONES

**6.2.1 Banco de Células:** Conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que garantice su viabilidad y estabilidad genética.

**6.2.2 Buffer:** Es una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno en el agua, estas disoluciones están compuestas por el [ión](#) común de un [ácido](#) débil o una [base](#) débil. Y el mismo ión común en una [sal](#) conjugada. Cuando un buffer es adicionado al agua, el primer cambio que se produce es que el pH del agua se vuelve constante. De esta manera, ácidos o bases (álcalis = bases) adicionales no podrán tener efecto alguno sobre el agua, ya que esta siempre se estabilizará de inmediato

**6.2.3 Conservación:** Los objetivos de la conservación es preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas; preservar los niveles de su productividad inicial; lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Siendo este último un factor esencial en la selección de un método de preservación.

**6.2.4 Fermentación:** Es un proceso, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración

en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas.

### **6.3 EQUIPOS**

- Reactor New Brunswick modelo Biofloc IIC con capacidad de 5 litros
- Horno
- Centrífuga
- Espectrofotómetro Génesis 5 (SPECTRONIC® MILTON ROY)

### **6.4 MATERIALES Y REACTIVOS**

#### **6.4.1 Materiales**

- Viales 1.5 ml
- Ampolletas 15 ml
- Pipetas
- Cajas de petri
- Papel filtro
- Venulas 50 ml

#### **6.4.2 Reactivos**

- Caldo BHI (4 L)
- Cajas con Agar BHI (200 ml)
- Cloruro de sodio 0.85% p/v (0.1275g)
- Glicerol (60.6 ml)
- Agua peptonada (85 ml)
- Colorantes de Gram

### **6.5 PROCEDIMIENTO**

#### **6.5.1 Obtención de *Escherichia coli* ATCC 25922**

- Obtener la cepa de forma liofilizada

- Desinfectar el tapón, humedeciendo un algodón con alcohol y pasarlo sobre la superficie, antes de abrir
- Hidratar el liofilizado, inyectando en el vial 1 ml de caldo BHI,
- Tomar 0.1 ml de la suspensión y adicionar por duplicado por superficie en 20 ml de agar BHI y homogenizar
- Incubar a 37 °C, por 24 horas, posteriormente verificar la pureza mediante coloración de Gram.

### 6.5.2 Elaboración del Banco

- Preparar 15 ml de una suspensión elaborada con solución salina 0.85% (p/v) y el microorganismo. Para esto adicionar una asada del microorganismo y ajustar al tubo 0.5 Mc Farland. ( $1.5 \times 10^8$  cel/ ml).
- Para establecer un banco de 100 viales con un volumen final de 1.5 ml, utilizar un erlenmeyer con capacidad total de 200 ml, para trabajar con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 100 ml.
- Inocular 10 ml (10% VET) de la suspensión de *Escherichia coli*, descrito anteriormente en 90 ml de caldo BHI estéril.
- Incubar por 12 horas a 37°C y 150 rpm. Realizar coloración de Gram.
- Preparar 100 ml de caldo BHI estéril más glicerol de manera que la concentración final sea del 30% (v/v), para esto aplique la siguiente formula:  

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$
 Donde:  
 C<sub>1</sub> es la concentración del glicerol (99%)  
 V<sub>2</sub> el volumen final (100ml)  
 C<sub>2</sub> es la concentración final (60%)

- En un erlenmeyer de 500 ml, adicionar 60.6 ml de glicerol y 39.3 ml de caldo BHI y mezclar con 100 ml del cultivo obtenido como se describió anteriormente.
- Dispensar 1,5 ml de la mezcla en tubos eppendorf.
- Conservar a temperatura de congelación ( 0°C a -2°C).

### **6.5.3 Obtención del inóculo**

- Utilizar un erlenmeyer de 1000 ml para trabajar con un volumen efectivo de 500 ml (VET),
- Inocular 50 ml (10% VET) de una suspensión de *Escherichia coli* (Tubo 0.5 Mc Farland), preparada a partir de un cultivo en medio BHI, en 450 ml de caldo estéril.
- Incubar por 12 horas a 37°C, 150 rpm verificando pureza mediante coloración de Gram.

### **6.5.4 Fermentación**

- Trabajar con un volumen efectivo de 3750 ml,
- Esterilizar con 3375 ml de caldo BHI en autoclave a 121°C por 35 minutos.
- Inocular con 375 ml de cultivo (10% VET)
- Incubar a una temperatura de cultivo de 37°C, con una agitación de 150 rpm y una aireación de 1 vvm durante 8 horas. Al inicio de la fermentación se ajusta las condiciones para que se mantengan constantes

### **6.5.5 Conservación**

- Tomar 100 ml de biomasa de la hora 8 de fermentación para 100 ampolletas

- Centrifugar por 30 minutos a 5000 rpm y lavar una vez con solución salina al 0.85% (p/v).
- Preparar 1,5 litros de solución buffer 8.3 y con la biomasa obtenida ajustar al tubo 0.5 Mc Farland cuya concentración celular es de  $1 \times 10^8$  (UFC/ml)
- Realizar prueba de pureza mediante coloración de Gram.
- Adicionar 15 ml en las ampollitas de envío, dejar a temperatura ambiente.

#### **6.5.6. Recuento Inicial**

- Tomar un vial y realizar diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-9}$ ,
- Tomar las últimas cuatro diluciones y sembrar por duplicado en superficie en agar BHI, escoger las cajas que se encuentren en un rango de 30-300 colonias
- Realizar conteo en placa e informar en UFC/ml