

Evaluación de la efectividad de diferentes métodos de conservación para las cepas de *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5

Marlyn Pérez-Rodríguez*, Yanely Díaz-Pérez, Natividad Oliva-Llanes, Direilis Díaz-García, Eulalia Gómez-Santiesteban, Ana Nelis San Juan-Rodríguez, Vivian León-Fernández y Daisy Dopico-Ramírez

Unidad Empresarial de Base (UEB) Bioprocesos Cuba 10. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Pablo Noriega, CP 33500. Quivicán. Mayabeque, Cuba.

*marlyn.perez@icidcamy.azcuba.cu

RESUMEN

La Unidad Empresarial de Base (UEB) Bioprocesos Cuba 10, del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), tiene entre sus prioridades la creación de bancos de células que le permitan el mantenimiento y conservación, a largo plazo, de los microorganismos que se utilizan para la investigación, desarrollo y producción de bioproductos. Así se garantiza el material biológico necesario para el sostén de estas líneas de trabajo, con ese objetivo se realizó el estudio que se expone. Para establecer los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 en glicerol, se utilizó el método de conservación por congelación ó criopreservación a -70 °C y el método alternativo de conservación en suelo estéril, a temperatura ambiente, se seleccionó para la cepa *Rhizobium* sp. El estudio se inició con la ejecución de los protocolos de trabajo, definidos para las cepas objeto de estudio, su aplicación permitió la conservación adecuada de las cepas *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, para mantener las propiedades de viabilidad, homogeneidad y pureza de los bancos establecidos. Se obtuvo una mejor respuesta en los bancos de células crioconservados con un 20 % de glicerol (criopreservante) a -70 °C, también se pudo corroborar la eficacia del método de conservación en suelo estéril para la cepa *Rhizobium* sp 3.

Palabras clave: *Rhizobium*, *Lactobacillus*, conservación, glicerol.

ABSTRACT

The Basic Business Unit Bioprocesos Cuba 10, ICIDCA, has among its priorities the creation of cell banks that allow the long-term maintenance and conservation of microorganisms used for research, development and production of bioproducts. In this way, the biological material necessary to support these lines of work is guaranteed, with that objective the study that is exposed was carried out. To establish the *Rhizobium* sp 3 and *Lactobacillus rhamnosus* LB / 103-1-5 strains banks in glycerol, the freezing or cryopreservation method was used at -70 ° C and the alternative method of conservation in sterile soil at room temperature, was selected for the *Rhizobium* sp. The study began with the execution of the working protocols defined for the strains under study and the application of these methods allowed the adequate conservation of the *Rhizobium* sp 3 and *Lactobacillus rhamnosus* LB / 103-1-5 strains, maintaining the properties of viability, homogeneity and purity of established banks. It was obtained a better response in the banks established with 20 % glycerol (cryopreservative) at -70 ° C, as well as the efficacy of the conservation method in sterile soil for the *Rhizobium* sp 3 strain.

Key words: *Rhizobium*, *Lactobacillus*, conservation, glycerol.

INTRODUCCIÓN

La conservación de microorganismos de interés industrial es una técnica básica en todo el proceso. La conservación ha de estar encaminada al mantenimiento de las cepas altamente productivas durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés (1).

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro y evitar que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan, al menos, el 70 u 80 % de las células y, por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (1,2).

Con el fin de dar respuesta a estas necesidades se han desarrollado, a través de los años, diferentes métodos para el mantenimiento y conservación de organismos como bacterias y hongos, entre los que se encuentran la liofilización, congelación, transferencia periódica, suspensión en agua destilada estéril, en capa de aceite mineral, desecación en papel de filtro, desecación en suelo, arena, silicagel, entre otros; con los que se busca detener el crecimiento de las células microbianas sin causar pérdida de viabilidad. Además de mantener la estabilidad y pureza de los organismos preservados (3-5). Por otro lado, la elección de un método u otro depende del tipo de microorganismo a preservar, del tiempo que se deseen mantener conservados los cultivos, de los recursos del laboratorio, así como el entrenamiento del personal encargado (6,7).

Sobre la base de estos aspectos y la disponibilidad técnica que existe en la UEB Bioprocesos Cuba 10, se realizó un estudio de varios métodos de conservación para garantizar la disponibilidad del material biológico que se utiliza en la investigación, desarrollo y producción de dos bioproductos: BIOENRAIZ y PROBICID.

Para la producción del BIOENRAIZ®, se parte de la cepa *Rhizobium* sp, cepa autóctona aislada de suelos de caña de azúcar y seleccionada de un total de 23 cepas. El BIOENRAIZ® es un bioestimulante cuyos componentes activos son los AIA, producidos por la bacteria *Rhizobium* sp. Este ejerce una acción positiva sobre la formación de las raíces y favorece la germinación, se utiliza como fitohormona en los procesos de enraizamiento en viveros de reproducción por esquejes o vitroplántulas, sustituye al químico Actiguard de Novartis, a otras hormonas de Abbot, Ecoscience y Bayery, al indolacético y otros indoles que hoy se importan en forma de reactivo, para ser usados en las biofábricas (8).

El PROBICID, se define como un aditivo alimentario microbiano, que beneficia al animal hospedero, mejorando el balance microbiano del tracto gastrointestinal (TGI), que eleva el sistema inmune, participa activamente en la supresión de patógenos, mejora la asimilación de alimentos poco digeribles y disminuye las sustancias tóxicas, influye en la conversión eficiente del alimento para el crecimiento y/o la producción, y contribuye, además, a una significativa disminución de la morbilidad y mortalidad (9).

Por la necesidad de contar con métodos de conservación que garanticen la preservación de estas cepas, dada su importancia económica, la disponibilidad del equipamiento, la conservación de las cepas y sus características se seleccionó el método de conservación por congelación o criopreservación a -70 °C. Heckly, citado por Perry (10), indica que ante estas bajas temperaturas, la viabilidad celular es casi independiente del período de almacenamiento; además, se cree que los individuos criopreservados, siguen siendo genéticamente estables. Esto ha sido respaldado en los resultados reportados por diferentes autores: Alfonso *et al.* (11), Parra *et al.* (12), Arencibia *et al.* (1), entre otros.

Como método alternativo se eligió la conservación en suelo estéril, a temperatura ambiente, para lo cual se seleccionó la cepa *Rhizobium* sp. El estudio se inició con la ejecución de los protocolos de trabajo, definidos para las cepas objeto de estudio.

Para el mantenimiento de un banco como este, los cultivos deben permanecer puros y homogéneos. Los criterios para evaluar el método seleccionado fueron la viabilidad y pureza microbiana. Lo expuesto anteriormente, constituye el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas objeto de estudio

- *Rhizobium* sp 3
- *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5.

Confección de los bancos de cepas

Para la confección de los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3 en glicerol, se partió de un cultivo fresco crecido en placas con medio agar YMA, incubado a 30 °C, por 48 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias, para ser inoculadas en medio YMA líquido. El cultivo se creció en zaranda a 30 °C, con una agitación de 150 r.p.m., durante 16 h. Al cultivo crecido, una vez verificada su pureza, le fue añadida una solución de glicerol al 20 y al 30 %, para el estudio de los bancos, a diferentes concentraciones de glicerol y se distribuyeron en alícuotas de 1 mL por vial, que se almacenaron a -70 °C.

El banco de cepas del *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril, método de conservación alternativo seleccionado, se elaboró a partir de un cultivo fresco crecido en placas con medio agar YMA, incubado a 30 °C, entre 48 y 72 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias, las cuales fueron descargadas en agua desmineralizada estéril. Una vez verificada la pureza por tinción de gram, se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos con 3 g de tierra estéril, los cuales fueron incubados a 30 °C, por 10 días. Al concluir el período de incubación los tubos fueron almacenados a temperatura ambiente.

Los bancos de cepas del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 en glicerol, fueron confeccionados a partir de la siembra del microorganismo en medio agar MRS, incubado a 37 °C, de 48 a 72 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias para ser inoculadas en caldo MRS, incubadas a 37 °C, por 16 horas. Al cultivo crecido, una vez verificada su pureza, le fue añadida una solución de glicerol al 20 y 30 %, para el estudio de los bancos a diferentes concentraciones de glicerol y se distribuyeron en alícuotas de 1 mL por vial, que se almacenaron a -70 °C.

Para la recuperación de los microorganismos criopreservados, se tomó un criovial de cada cepa bacteriana, sometido a una temperatura de 37 °C, en baño serológico, con agua destilada, hasta su descongelación por, aproximadamente, cinco minutos (13).

En la realización de los estudios de estabilidad de los bancos, se tomó como tiempo de referencia un año y se controló para evaluar la eficacia del método de conservación en estudio, mediante la medición de la pureza y la viabilidad de cada banco.

Evaluación de la eficacia del método de conservación

Como variables de respuesta seleccionadas para evidenciar la efectividad de estos métodos y evaluar si los organismos conservaban sus características fenotípicas, genotípicas y el potencial industrial, se utilizaron las pruebas de viabilidad y pureza.

Verificación de la viabilidad de los bancos

La verificación de la viabilidad de los bancos se llevó a cabo mediante diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} , en solución salina (NaCl 0.9 %) y se sembraron en los medios específicos, según el método descrito por Pérez *et al.* (14).

Las placas se incubaron a la temperatura de 30 °C, durante el tiempo definido para cada microorganismo; después de este tiempo se contaron las colonias y se calculó la viabilidad de los bancos. El número de viables se definió como la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), contadas en cada traza (número de colonias promedio) multiplicada por 10 (volumen de la alícuota) y por el inverso del factor de dilución, para definir las como UFC/mL. Las especificaciones de calidad de los bancos se definieron para una viabilidad límite, en un orden por debajo de la viabilidad de partida del banco creado.

Verificación de la pureza microbiológica, mediante crecimiento en placa de medios indicadores

Para la verificación de la pureza se toman viales de cada uno de los bancos transfiriendo su contenido a un tubo con 9 mL de caldo triptona soya, que se incubaba a 35 ± 2 °C, durante 7 días. Posteriormente, se llevan a cabo diluciones seriadas en solución salina peptonada y se realiza la siembra en superficie, en placas con medio agar triptona soya, que se incuban en posición invertida a 35 ± 2 °C, durante 72 horas. A las placas crecidas se les realizó tinción de Gram, según describió Kuneman *et al.* (15) y se analizaron por inspección visual al microscopio estereoscópico.

Como criterio de pureza microbiológica se tomó la morfología de las colonias y sus habilidades de crecimiento en los diferentes medios de cultivo, así como la homogeneidad de las células por tinción de Gram.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de estabilidad de los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3

Los resultados del control establecido para los bancos de cepa del *Rhizobium* sp 3 en glicerol, a diferentes concentraciones, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Rhizobium* sp 3 conservada en glicerol al 20 y al 30 %

| Días | 20 % Glicerol (Ufc/ml) | Pureza | 30 % Glicerol (Ufc/ml) | Pureza |
|------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| 0 | 2.50E+10 | Cultivo puro | 1.60E+10 | Cultivo puro |
| 15 | 1.90E+10 | Cultivo puro | 1.55E+10 | Cultivo puro |
| 30 | 1.60E+10 | Cultivo puro | 1.05E+10 | Cultivo puro |
| 45 | 1.48E+10 | Cultivo puro | 1.15E+10 | Cultivo puro |
| 60 | 1.40E+10 | Cultivo puro | 1.20E+10 | Cultivo puro |
| 90 | 1.30E+10 | Cultivo puro | 1.10E+10 | Cultivo puro |
| 120 | 2.00E+10 | Cultivo puro | 1.55E+10 | Cultivo puro |
| 150 | 2.10E+10 | Cultivo puro | 1.25E+10 | Cultivo puro |
| 180 | 2.15E+10 | Cultivo puro | 1.60E+10 | Cultivo puro |
| 210 | 2.05E+10 | Cultivo puro | 1.50E+10 | Cultivo puro |
| 240 | 2.20E+10 | Cultivo puro | 1.35E+10 | Cultivo puro |
| 270 | 2.25E+10 | Cultivo puro | 1.55E+10 | Cultivo puro |
| 300 | 2.20E+10 | Cultivo puro | 1.60E+10 | Cultivo puro |

Los controles realizados para ambos bancos confirmaron que el método de conservación seleccionado cumple con los indicadores establecidos, lo cual corrobora los resultados reportados por Díaz Alcántaras (16). En la figura 1 se puede observar que para los dos bancos estudiados la viabilidad se mantuvo en el mismo orden en que estos fueron creados, que es un indicativo de la efectividad del método.

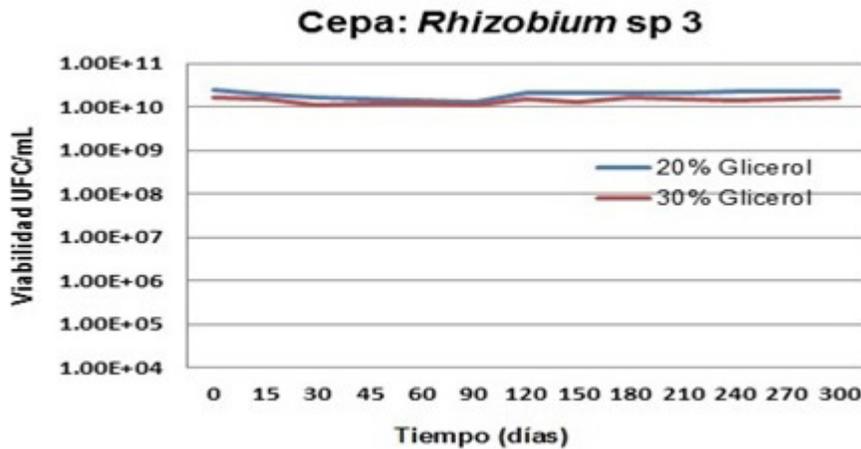


Figura 1. Viabilidad de la cepa del *Rhizobium* sp 3 conservada en glicerol (20 y 30 %), por período de un año.

Mediante el uso del software Statgraphics Centurion se realizó un análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de glicerol aplicados. Para ello se realizó una comparación de líneas de regresión UFC mL versus tiempo (días) por porcentaje de glicerol.

De este análisis se obtuvo el modelo ajustado de regresión lineal para describir la relación entre UFC mL, tiempo en días y porcentaje de glicerol. La representación gráfica de las ecuaciones del modelo ajustado para cada porcentaje de glicerol se muestra en la figura 2.

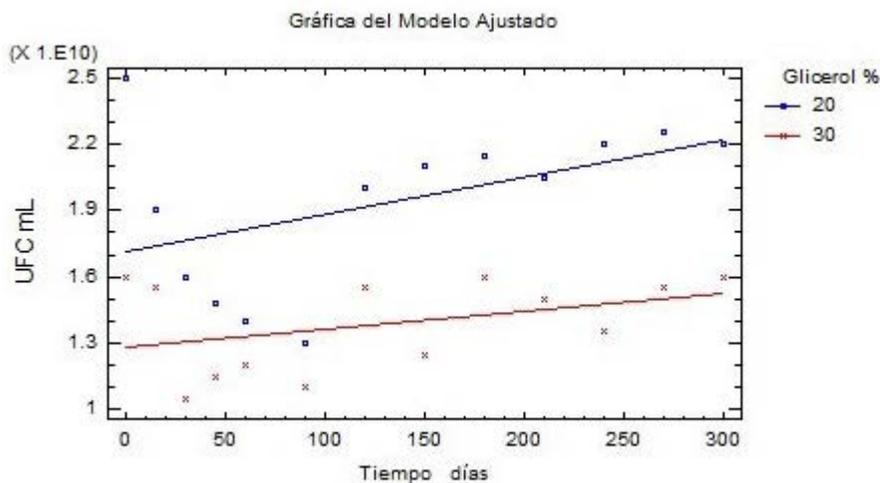


Figura 2. Modelo ajustado de los bancos de cepa del *Rhizobium* sp 3 a diferentes niveles del criopreservante empleado (glicerol al 20 y 30%).

El valor-P obtenido, para el modelo ajustado, fue de 0.0003 (menor a 0.05), lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0 %.

El análisis ANOVA para variables (tabla 2), permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Dado el valor-P para los interceptos es menor que 0.01, existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes porcentajes de glicerol, con un nivel de confianza del 99 %.

Tabla 2. ANOVA adicional para variables según el orden de introducción

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Tiempo días | 3.8499E19 | 1 | 3.8499E19 | 4.79 | 0.0394 |
| Intercepto | 1.92794E20 | 1 | 1.92794E20 | 24.01 | 0.0001 |
| Pendientes | 4.39354E18 | 1 | 4.39354E18 | 0.55 | 0.4673 |
| Modelo | 2.35686E20 | 3 | | | |

Por el análisis realizado, se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas, para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados en los bancos de cepa de *Rhizobium* sp 3; el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol, tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad, durante el tiempo de estudio (1 año).

Conservación del *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril

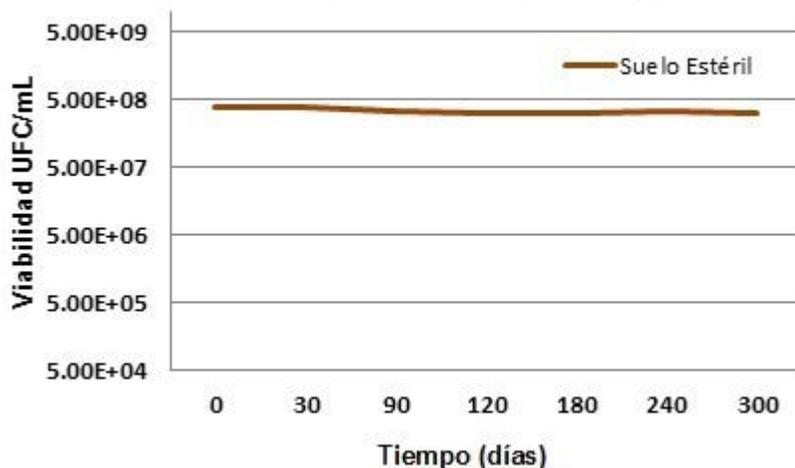
En relación con el estudio del banco de *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril, método alternativo seleccionado, sus resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Rhizobium* sp 3 conservada en suelo estéril

| Días | Suelo estéril (UFC/mL) | Pureza |
|------|------------------------|--------------|
| 0 | 3.90E+08 | Cultivo puro |
| 30 | 3.80E+08 | Cultivo puro |
| 90 | 3.35E+08 | Cultivo puro |
| 120 | 3.25E+08 | Cultivo puro |
| 180 | 3.10E+08 | Cultivo puro |
| 240 | 3.30E+08 | Cultivo puro |
| 300 | 3.10E+08 | Cultivo puro |

Como se puede observar, en el seguimiento realizado al banco (figura 3), se logró mantener en el mismo orden la viabilidad, durante el tiempo fijado para el estudio, lo que indica que el método de conservación empleado es eficaz. Estos resultados se comprobaron mediante los ensayos realizados en relación con la pureza y los niveles de viabilidad obtenidos.

Cepa: *Rhizobium* sp 3

**Figura 3.** Viabilidad de la cepa del *Rhizobium* sp 3 conservada en suelo estéril por período de un año.

Estudio de estabilidad de los bancos de cepa del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5

Los resultados obtenidos del control establecido para los bancos de cepa del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, a diferentes porcentajes de glicerol como agente crioprotector, se exponen en la

tabla 4 y en la figura 4. Como se puede observar, se logró obtener un elevado nivel de supervivencia para ambos bancos, lo que indica la efectividad del método de conservación y confirma los resultados reportados por Brizuela (9) en la conservación del *Rhizobium* a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabla 4. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, conservada en glicerol al 20 y 30 %

| Días | 20 % Glicerol (UFC/mL) | Pureza | 30 % Glicerol (UFC/mL) | Pureza |
|------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| 0 | 1.50E+09 | Cultivo puro | 1.00E+09 | Cultivo puro |
| 15 | 1.40E+09 | Cultivo puro | 1.00E+09 | Cultivo puro |
| 30 | 9.00E+08 | Cultivo puro | 1.00E+09 | Cultivo puro |
| 60 | 1.60E+09 | Cultivo puro | 1.20E+09 | Cultivo puro |
| 90 | 1.30E+09 | Cultivo puro | 1.10E+09 | Cultivo puro |
| 120 | 8.90E+08 | Cultivo puro | 9.70E+08 | Cultivo puro |
| 150 | 1.50E+09 | Cultivo puro | 9.50E+08 | Cultivo puro |
| 180 | 1.10E+09 | Cultivo puro | 9.00E+08 | Cultivo puro |
| 210 | 1.10E+09 | Cultivo puro | 8.90E+08 | Cultivo puro |
| 240 | 1.20E+09 | Cultivo puro | 1.10E+09 | Cultivo puro |
| 270 | 1.40E+09 | Cultivo puro | 1.10E+09 | Cultivo puro |
| 300 | 9.50E+08 | Cultivo puro | 8.00E+08 | Cultivo puro |
| 330 | 5.30E+08 | Cultivo puro | 5.90E+08 | Cultivo puro |
| 360 | 7.90E+08 | Cultivo puro | 4.10E+08 | Cultivo puro |

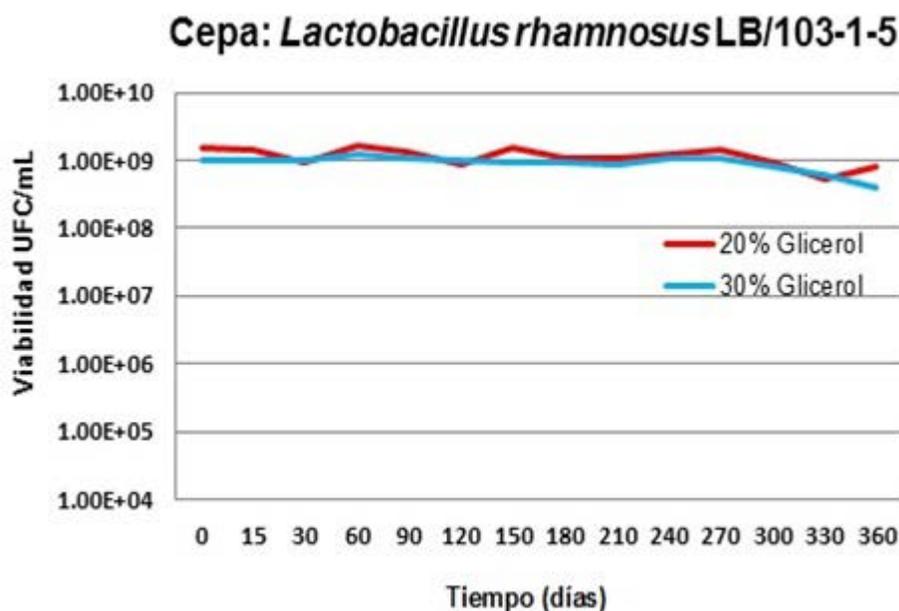


Figura 4. Viabilidad de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 conservada en glicerol (al 20 y 30 %), por período de un año.

En el análisis estadístico realizado para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de glicerol aplicados, se ejecutó una comparación de líneas de regresión UFC mL versus tiempo (días) por porcentaje de glicerol. La representación gráfica de las ecuaciones del modelo ajustado para cada valor de porcentaje de glicerol se muestra en la figura 5.

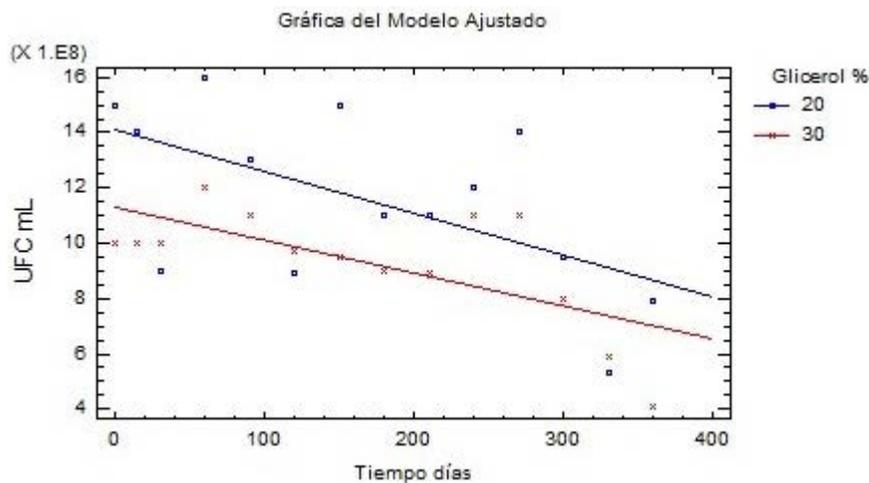


Figura 5. Ajuste del modelo para la conservación de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 a los porcentajes de glicerol empleados (glicerol al 20 y 30%).

El valor-P obtenido, para el modelo ajustado, fue de 0.0014 (menor a 0.05), lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0 %.

El análisis ANOVA para variables (tabla 5), permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Dado que el valor-P para los interceptos es menor que 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas, entre los interceptos para los diferentes porcentajes de glicerol con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 5. ANOVA Adicional para variables, según el orden de introducción

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Tiempo días | 6.81373E17 | 1 | 6.81373E17 | 13.91 | 0.0010 |
| Interceptos | 3.54375E17 | 1 | 3.54375E17 | 7.24 | 0.0128 |
| Pendientes | 1.11296E16 | 1 | 1.11296E16 | 0.23 | 0.6379 |
| Modelo | 1.04688E18 | 3 | | | |

Del análisis realizado se puede concluir, que existen diferencias estadísticamente significativas, para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados en los bancos de cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5; el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado (1 año).

CONCLUSIONES

Según los resultados del estudio realizado, se pueden plantear las siguientes conclusiones:

1. Se establecieron y controlaron los bancos de cepa del *Rhizobium* sp y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, con el método de conservación de congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y como agente criopreservante el glicerol al 20 y al 30 %.
2. Se estableció el banco de cepa del *Rhizobium* sp en suelo estéril como método de conservación alternativo.
3. La eficacia de los métodos de conservación empleados, se midió mediante el empleo de los ensayos de viabilidad y pureza en los bancos objeto de estudio, por un período de un año.
4. La viabilidad de los bancos objeto de estudio se mantuvo por encima del valor establecido para el control de calidad y el cultivo puro.

5. Se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas para los dos niveles de glicerol aplicados, en los bancos de cepa de *Rhizobium* sp 3 y el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol, tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado.
6. En los bancos de cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados, el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado.
7. Se pudo comprobar que el método de conservación en suelo estéril de la cepa *Rhizobium* sp 3 fue eficaz y se mantuvo la pureza del banco y la viabilidad en el mismo orden en que se creó.
8. Los resultados de este estudio demuestran que los métodos de conservación empleados para las bacterias estudiadas son eficaces, ya que permiten obtener bancos de células estables, según los criterios evaluativos establecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arencibia, D. F.; Rosario, L. A.; Gámez, R. 2008. I Taller Científico de los Laboratorios LIO-RAD, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos. Finlay Ediciones. ISBN: 978-959-7076-20-9.
2. Juarros, E.; Tortajada, C.; García, M.D.; and Uruburu F. 2000. Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C .: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología SEM*. 9, 28-33.
3. Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*. 14(3), 189–195
4. García, M.; Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30, 12–16.
5. Sarmiento, Y.; Hazel, A.; Cárdenas, D. 2013. Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp y *Azotobacter* sp conservados por diferentes métodos *Revista Colombiana de Biotecnología*. XV (1), 150–158.
6. Rico, M.; Piattoni, C.; González, C.; Monela, R.; Latorre, M.; Lura, M. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista FABICIB*. 8, 163– 172.
7. Weng, Z.; Olvido, E.; Álvarez, I. 2005. Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 43(3), 1–4.
8. San Juan, A.; Gómez, E.; Guevara, Y.; Pérez, M.; Fraga, R.; León, V.; *et al.* 2017. Producción de bioproductos en la UEB Bioprocesos Cuba 10. Un aporte a la seguridad alimentaria sostenible. Premio Innovación Tecnológica. CITMA Mayabeque.
9. Brizuela, M. A. 2003. “Selección de Cepas de Bacterias Lácticas para la Obtención de un Preparado con Propiedades Probióticas y su Evaluación en Cerdos” Tesis de Opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Biblioteca del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
10. Perry, S. F. 1995. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. En J. G. Day, & M. R. McLellan. (Ed.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Primera ed., págs. 21-30). New Jersey: Humana Press Inc.
11. Alfonso, M.; González, N.; López, N. 2015. Viabilidad y características culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de una colección bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 44(1):105-111.

12. Parra, S. L.; Pérez, M. M.; Bernal, M.; Suarez, Z.; Montoya, D. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Nova - publicación científica ISSN:1794-2470 vol.4 No. 5 enero - junio de 2006:1-116
13. Castañeda, R. A.V. 2015. Pruebas de viabilidad a cinco cepas bacterianas criopreservadas y estudio para la liofilización de las mismas, evaluando tres compuestos protectores, pertenecientes al banco genético del laboratorio de microbiología de la facultad del medio ambiente y recursos naturales de la universidad distrital Francisco José de Caldas. Tesis de Grado. Facultad de ciencias y educación Proyecto curricular de licenciatura en biología. Bogotá D.C. p. 25.
14. Pérez-Reytor, D.C.; Domínguez, I.; Sosa, A.E. 2002. Evaluación del método de siembra en placa "traza de la dilución" en el control de calidad de bancos de *Escherichia coli* K12. Biotecnología Aplicada. 19:169-73.
15. Kuneman, E.W.; Allen, S.D. 1992. Diagnóstico Microbiológico. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
16. Díaz Alcántara, C.A. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis Doctoral. Universidad de León.