Bacteriología

Universidad Católica de Manizales

DETERMINACIÓN DEL MEJOR MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA MANTENER LA ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE *Gluconacetobacter sacchari*, ALMACENADA EN LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA UCM

LAURA JULIANA OSSA RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA
MANIZALES
2018

DETERMINACIÓN DEL MEJOR MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA MANTENER LA ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE *Gluconacetobacter sacchari*, ALMACENADA EN LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA UCM

LAURA JULIANA OSSA RODRIGUEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
BACTERIÓLOGA

Director:
NARMER FERNANDO GALEANO

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA
MANIZALES
2018

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma de Director del Trabajo de Grado

_____

Firma del Presidente del Comité Académico

_____

Firma de Evaluador

DEDICATORIA

A mi Madre, Claudia Rodríguez, la que, sin importar las circunstancias y dificultades, siempre se ha sacrificado por mi bienestar dándome ánimo y consuelo cuando más lo necesito. Eres mi motor, la luz de mi vida, MI TODO. Te amo demasiado y este logro tan importante es por ti y para ti.

A mi Familia, Abuelos, Tías y primos los cuales nunca dudaron de mis capacidades y siempre me ayudaron a salir adelante, hasta el último momento. Los Amo.

A mi Angel, Ancizar Galeano, quien hoy en día se sentiría muy orgulloso de su ´´negrita´´, por sus logros obtenidos y por los que aún faltan.

A mis amigos, Ana, Valentina, Camila, Stepha, Luisa, Daniela, Eliana, Estefanía, Esteban y Cielo, porque cada uno de ustedes ha aportado a mi proyecto de vida, ayudándome a crecer como profesional integral. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Instituciones

A COLCIENCIAS, por la financiación parcial del trabajo de investigación: DETERMINACION DEL MEJOR METODO DE CONSERVACION PARA MANTENER LA ESTABILIDAD GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE *Gluconacetobacter sacchari*, ALMACENADA EN LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA UCM.

A la Universidad Católica de Manizales y sus dependencias como el IMBA (Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial) por permitirme el ingreso y uso de materiales e instalaciones para la realización del proyecto.

A el Semillero de Investigaciones Biotecnológicas (SIBIO), por ayudar y guiarme en la formación como profesional integral.

Doctores e investigadores

- M. Sc Narmer Fernando Galeano, investigador de la Universidad Católica de Manizales, y tutor principal del proyecto, por sus aportes cognitivos, prácticos y consejos que ayudaron no solo a la realización del proyecto, sino a mi formación como profesional integral.
- M. Sc Marta Cecilia Ramírez, docente de la Universidad Católica de Manizales, por alentarme, brindarme su apoyo incondicional y orientación permanente en el proceso.
- M. Sc Beatriz Elena Padilla, investigadora y docente de la Universidad Católica de Manizales, por siempre brindarme una cara amable, con buenos consejos, orientaciones y alentarme a seguir adelante.
- M. Sc Mónica Quintero Moreno, investigadora, por su asesoría en los momentos precisos.
- Investigadora Tatiana Valenzuela, por brindarme seguridad, motivación y asesorías desde el inicio de formulación del proyecto.

Estudiantes de Pregrado y Compañeros

- Andrea López Mazuera y Annita Fernanda Mena por su constante apoyo y colaboración, desde el inicio hasta el final.
- Cristian Cuellar, por su apoyo incondicional, asesorías y colaboración hasta el último momento.
- Ana Parra, Stephanie Herrera, Cristian Valencia y Cielo Herrera por su comprensión, por alentarme en los momentos difíciles, y brindarse su apoyo cuando más lo necesite.

Agradecimientos personales

- Dios por permitirme cumplir un logro tan importante en mi vida
- A mi Madre, la luz de mis ojos, por alentarme y apoyarme incondicionalmente
- A mis Abuelos, Tías y Primos por siempre estar para mí, brindándome su apoyo.
- A mis amigas, Valentina, Camila, Luisa, Daniela, Estefanía y Eliana, por alentarme a seguir adelante y apoyarme cuando más lo necesite, sin importar cuando y donde.
- A mi amigo, Manuel, por enseñarme que debo ser fuerte, y a no desistir cuando todo se ponga difícil, y sobre todo por soportar mis crisis.

CONTENIDO

Contenido

1 INTRODUCCIÓN 13

2 OBJETIVOS 14

2.1 OBJETIVO GENERAL. 14

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS. 14

3 REFERENTE TEÓRICO 15

3.1 Conservación microbiana. 15

3.2 Métodos de conservación microbiana. 15

3.2.1 Almacenamiento criogénico. 15

3.2.2 Suspensión en agua destilada estéril 16

3.2.3 Preservación en papel de filtro. 16

3.2.4 Preservación en aceite mineral. 16

3.3 Solubilizacion de fósforo. 17

3.4 NBRIP 17

3.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). 17

3.6 Gluconacetobacter sacchari: 18

3.7 Antecedentes 18

4 MATERIALES Y MÉTODOS 20

4.1 Tipo de estudio 20

4.2 Población y muestra 20

4.3 Procedimiento 20

4.3.1 Preparación de las muestras a conservar: 20

4.3.2 Conservación de BPCVs por crioperservacion a -80ºC. 20

4.3.3 Conservación de BPCVs por desecación sobre discos de papel filtro. 20

4.3.4 Conservación de BPCVs por suspensión en agua destilada estéril. 21

4.3.5 Preservación en aceite mineral 21

4.3.6 Determinación de la capacidad de solubilización de fosforo: 21

4.3.7 Prueba Viabilidad Celular. 21

4.3.8 Análisis estadístico 22

5 RESULTADOS 23

5.1 Densidades ópticas de crecimiento bacteriano 23

5.2 Descripción macroscópica 23

5.3 Descripción microscópica 24

5.4 Determinación de la viabilidad celular: 24

5.5 Graficas porcentaje de viabilidad celular 25

5.6 Determinación de la capacidad de solubilizacion de fosforo 27

5.7 Graficas de la prueba de solubilización de fosforo 28

6 DISCUSIÓN 31

6.1 Densidades ópticas de crecimiento bacteriano 31

6.2 Descripción macroscópica y microscópica 31

6.3 Reactivación de las cepas post-conservacion 32

6.4 Determinación de la viabilidad celular 32

6.4.1 Criopreservación 33

6.4.2 Agua destilada 33

6.4.3 Papel Filtro 34

6.4.4 Aceite Mineral 34

6.5 Prueba de solubilización de fosforo 35

6.5.1 Criopreservacion 35

6.5.2 Agua destilada 35

6.5.3 Aceite Mineral 35

6.5.4 Papel Filtro 36

6.6 Índice de Solubilización de fosfatos 36

7 CONCLUSIONES 38

8 RECOMENDACIONES 39

9 ANEXOS 40

9.1 Anexo 1. Procedimiento de reactivación de las cepas 40

9.2 Anexo 2. Procedimiento de recolección de la biomasa 40

9.3 Anexo 3. Preparación de medios de cultivo 40

9.3.1 Agar APD 40

9.3.2 Agar NBRIP 41

9.3.3 Preparar caldo DYGS siguiendo la fórmula para un litro. 41

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Densidades Ópticas (λ 640nm) 23
Tabla 2. UFC obtenidas los diferentes periodos de tiempo post-conservacion en medio APD. Cepa GIBI014 42
Tabla 3. UFC obtenidas los diferentes periodos de tiempo post-conservacion en medio APD. Cepa GIBI031 43
Tabla 4. Índice de solubilización obtenidos en los diferentes métodos y periodos de tiempo post-conservacion. Cepa GIBI014 42
Tabla 5. Índice de solubilización obtenidos en los diferentes métodos y periodos de tiempo post-conservación. Cepa GIBI031. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1Descripción macroscópica de cepas *Gluconacetobacter sacchari*. A. GIBI014 y B. GIBI0031 23
Figura 2 Descripción microscópica de cepas Gluconacetobacter sacchari. A. GIBI014 B. GIBI031. 24
Figura 3 Determinación viabilidad celular. A. Método de Crio preservación. B. Método de Agua Destilada Estéril. C. Método de Papel Filtro 25
Figura 4 Determinación viabilidad celular. Método Aceite Mineral 25
Figura 5 Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de criopreservación 26
Figura 6 Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de agua destilada. 26
Figura 7. Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de papel filtro 26
Figura 8. Grafica unificada de los porcentajes de viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Métodos: criopreservación, agua destilada estéril y papel filtro 27
Figura 9. Prueba solubilización de fosforo en medio NBRIP, cepa GIBI014 A. Método de criopreservación a las 24 horas de incubación, cepa GIBI014. B. Método de criopreservación a las 48 horas de incubación, cepa GIBI014. C. Método de criopreservación a las 72 horas de incubación, cepa GIBI014. 28
Figura 10. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de criopreservación. 28
Figura 11. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de agua destilada 29
Figura 12. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de aceite mineral 29
Figura 13. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de aceite mineral 30

LISTA DE FORMULAS

Formula 1 Índice de solubilización (IS) según Kumar y Narula, (1999). 21
Fórmula 2. Porcentaje de viabilidad celular..... 22

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos han sido usados desde los tiempos más remotos por los humanos; en la actualidad la importancia de estos, radica en la posibilidad de emplear microorganismos para la obtención de productos o sustancias de utilidad para el hombre. La biotecnología, que estudia los procesos industriales en los cuales interviene microorganismos, se aprovecha, por así decir, de la rápida capacidad de crecimiento de éstos y de su cultivo a gran escala para producir las sustancias necesarias en cantidades apreciables y en el menor tiempo posible. La necesidad de mantener la estabilidad de estos microorganismos, requiere tener en cuenta factores como la alteración de las condiciones de crecimiento y supervivencia que a su vez pueden inducir cambios morfológicos, variación en los componentes celulares y presencia de mutaciones espontáneas (Blanco y Brown, 2010)

Cuando un microorganismo como *Gluconacetobacter sacchari* es mantenido por fuera de su ambiente natural es posible que las adaptaciones a estas nuevas condiciones determinen cambios en la viabilidad celular; así como cambios genéticos que hacen que se reprima o cambien los genes debido a las mutaciones que modifican al microorganismo de manera fortuita, cambios en la actividad metabólica y por ende un deterioro en la actividad enzimática, alterando las cepas puras y la funcionalidad de estas, perdiendo su calidad e importancia para la mejora del crecimiento vegetal e incluso la pérdida de la cepa.

Por ello se hace necesario implementar métodos de conservación de las cepas microbianas lo cual no es tarea fácil, ya que se debe garantizar la viabilidad, preservar los niveles de su productividad inicial y salvaguardar la pureza genética del cultivo sin perder ninguna de sus propiedades bioquímicas; por lo que es indispensable elegir la técnica correcta en función al tipo de cultivo, susceptibilidad del microorganismo al proceso de conservación y tiempo de preservación (Metrix Laboratorios, 2015).

La información referente a la conservación es escasa y no se encuentran antecedentes sobre el impacto que puedan tener las diferentes metodologías sobre características metabólicas de las bacterias de interés. De igual forma hay que tener en cuenta que también son escasos los productos biológicos que ayuden a la mejora de los cultivos de una manera más competente y eficiente con respecto a los productos químicos. Por tanto “no existe un método universal a largo plazo que mantenga una conservación adecuada por lo que se hace necesario la evaluación de los diferentes métodos de acuerdo a las particularidades de los microorganismos” (Escobar, L. P. B., Ríos, D. M. F., Gómez, M. O., & Franco, M. 2016, García y Uruburu, 2005) y las características de interés que se desea mantener; por lo cual es fundamental garantizar la disponibilidad de las cepas para poder ser estudiadas y aprovechar su potencial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el mejor método de conservación para garantizar la estabilidad bioquímica de *Gluconacetobacter sacchari* almacenada en la Colección de Microorganismos de la UCM.

.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar la estabilidad bioquímica de *Gluconacetobacter sacchari*, como bacterias promotoras de crecimiento vegetal mediante diferentes métodos de conservación, después del tiempo establecido.
- Determinar mediante diferentes pruebas la viabilidad de las bacterias conservadas durante distintos periodos tiempo.
- Verificar los diferentes procesos y métodos para lograr buenas conservaciones en futuros proyectos.

3 REFERENTE TEÓRICO

3.1 Conservación microbiana.

Los microorganismos son indispensables en diferentes áreas de aprovechamiento para los seres humanos, ya que cumplen un papel protagónico en la industria alimenticia, textil, farmacéutica; la agricultura, biomedicina, y para investigaciones en las diversas áreas. Sin embargo, su estancia por fuera de su ambiente natural (*ex situ*) puede provocar alteraciones a nivel morfológico, genético y bioquímica de las cepas, inclusive la pérdida de la viabilidad. Por lo tanto, se utilizan métodos para preservar los microorganismos, y de esta manera evitar dichos efectos poco beneficiosos sobre las cepas de interés. (Escobar, L. P. B., *et al*, 2016). Durante la conservación microbiana se presentan diferentes condiciones y variedad de factores que hacen que el microorganismo disminuya su metabolismo, simulando los mecanismos naturales de respuesta de la célula ante el estrés.

3.2 Métodos de conservación microbiana.

Los métodos de conservación se clasifican según diversos factores como el tiempo, temperatura, costos, viabilidad celular y así se agrupan en 2 grupos: métodos a largo plazo, métodos a corto plazo o métodos alternativos'. (Cano, D, 2014).

3.2.1 ***Métodos a largo plazo****.*

Estos métodos evitan al máximo la proliferación sucesiva de los microorganismos, garantizando su estabilidad genética (evitando mutaciones, que se pasan de generación en generación), estabilidad bioquímica y características de interés del microorganismo que lo hacen importante en algún área. De acuerdo a lo anterior estos son métodos de anabiosis, esto quiere decir, que detienen el metabolismo del organismo puesto en estas condiciones. (Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. 2008). Entre ellos encontramos:

3.2.1.1 Almacenamiento criogénico.

Ha sido reportado como el mejor método, ya que pone a los organismos en un estado de anabiosis deteniendo el crecimiento de las células microbianas, sin provocar la muerte y garantizando la estabilidad genética al evitarse la aparición de generaciones sucesivas. (Cárdenas, Y, 2010). En la criopreservación las células son resuspendidas en sustancias crioprotectoras, de bajo peso molecular, lo que permite la entrada de estos a la célula, para posteriormente ser congeladas a temperaturas bajo cero, como son usadas frecuentemente -70 o -80°C, estas se almacenan durante un periodo de tiempo, para luego ser reactivadas, reanudando su funcionamiento (Leibo & Pool, 2011). La criopreservación se lleva a cabo a diferentes velocidades y temperaturas dependiendo del crioprotector utilizado y el microorganismo conservado.

3.2.2 ***Métodos a corto plazo o alternativos:***

Estos métodos son utilizados cuando no se cuenta con las condiciones necesarias para implantar métodos de largo plazo, como costos, infraestructura, personal, equipos. Sin embargo, la elección de método depende indispensablemente de la especie a conservar y las condiciones que se tengan en cada laboratorio. Son considerados métodos de hipobiosis, ya que reducen el metabolismo de los microorganismos, pero no lo detienen completamente. (Arencibia, D *et al. 2008)* Entre ellos podemos encontrar:

3.2.2.1 Suspensión en agua destilada estéril

Este método ha sido reportado con altos porcentajes de viabilidad en conservaciones con más de cinco años (Cano, D, 2014). El agua en el entorno evita cambios bioquímicos y morfológicos, dejando a los microorganismos en un estado de hipobiosis (disminución del metabolismo) (Nakasone *et al*., 2004). Es un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos por períodos prolongados, evitando mutaciones.

3.2.2.2 Preservación en papel de filtro.

Utilizando este método, se elimina la mayor cantidad de agua posible en el medio, utilizando papel filtro Whatmann, impregnado de la suspensión microbiana (7.5 x 10^8 UFC/ml). Luego se lleva a secado en condiciones estériles, utilizando un secado de silica y se almacena en un refrigerador a 4°C. (García, D, 2008)

3.2.2.3 Preservación en aceite mineral.

Se basa en cubrir la cepa a conservar, con aceite mineral estéril, la cual debe estar en medio nutritivo líquido o sólido, esto con el fin de limitar la obtención de oxigeno de la atmosfera, reduciendo el metabolismo de microorganismos aerobios, que utilizan el oxígeno para su desarrollo celular; además de conservar el medio de cultivo hidratado. Estos cultivos pueden mantenerse por varios años a temperatura ambiente 15-20°C (Nakasone *et al*., 2004). Es un método que no requiere de equipos caros, ni procedimientos laboriosos. (D, Rodríguez. Y, Gato, 2010)

Los métodos de conservación para cepas microbianas deben cumplir ciertos objetivos, los cuales son:

1. ***El cultivo a conservar debe ser puro, evitando que se produzcan contaminantes durante el proceso de conservación.***

2. ***Durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80 % de las células.***

3. ***Las células deben permanecer genéticamente estables.***

La elección del método de conservación se debe realizar según las condiciones de cada laboratorio (personal científico, disponibilidad de equipos, infraestructura, costos); y también se debe tener en cuenta el microrganismo a conservar, ya que cada especie se comporta de manera diferente a los procesos de conservación. Pero siempre se debe partir del mantenimiento de las características intrínsecas de cada cepa (estabilidad genética y bioquímica) (Escobar, L. P. B., *et al*, 2016, García Uruburu, 2005)

3.3 Solubilización de fósforo.

El fósforo es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, ya que este es indispensable en ciertos procesos bioquímicos de los mismo, además, es parte fundamental del ADN de cada organismo. (Ramírez, L. C. C., Galvez, Z. Y. A., & Burbano, V. E. M. 2014). Las plantas deben absorberlo del suelo, el problema es que este se encuentra en muy bajas concentración, (5 y 30 mg kg-1). Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación, disminuyendo su disponibilidad de absorción para las plantas (Restrepo, G. M., Sánchez, O. J., Marulanda, S. M., Galeano, N. F., & Taborda, G. 2017). Los fertilizantes químicos, poseen en su gran mayoría fosforo inorgánico, pero estos también son precipitados en el suelo, no tornándose solubles para ser los cultivos. Por lo tanto, se considera, importante la capacidad solubilizadora de diferentes microorganismos del suelo, tomándose como alternativa fundamental para incrementar la cantidad del nutriente soluble, para el aprovechamiento de los cultivos (Bobadilla Henao, C., & Rincón Vanegas, S. C. (2008)

3.4 NBRIP (National Botanical Research Institute´s Phosphate)

Este medio permite la identificación de microorganismos capaces de solubilizar el fosforo inorgánico, su composición es: glucosa 10g, como fuente de carbono; Ca_3 PO_4 5g, $MgCl_2$ $_6H_2O$ 5g 0,25g, KCl 0,2g, $(NH_4)^2$ SO_4 0.1g, Agar-agar 20g, H_2O destilada 1L) (Ramírez, L. C. C *et, al* 2014) al cual se le añadió azul de bromocresol como indicador de pH a una concentración de 0,025 g/l, permitiendo determinar la producción de ácido por un cambio de coloración de azul a amarillo.

3.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

Los microorganismos promotores de crecimiento vegetal cumple un papel fundamental en la captación de diversos nutrientes, en la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el desarrollo radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en: la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas como las auxinas; fundamentalmente el ácido indo acético (AIA), promoción del crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, mejora de la absorción de agua y nutrientes, solubilización los fosfatos di y tricálcicos e inhibición del crecimiento de

microorganismos patógenos lo cual se conoce como biocontrol (E, Nazarena.2015). Diversos géneros bacterianos se han aislado de las plantas y el suelo rizosférico entre ellos el género Gluconacetobacter han sido reportadas como BPCVs. (Torriente, D, 2010).
El empleo de BPCV, fortalece el desarrollo y producción de cultivos tales como arroz, trigo y maíz. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) adquiere relevancia y puede ser incorporada a través de ciertas asociaciones de BPCV para aportar nitrógeno (N) al agro ecosistema (Camelo R, 2011).

3.6 Gluconacetobacter sacchari:

Pertenece a la familia Acetobacteraceae y al género Gluconoacetobacter, es considerada una especie de bacteria acética, perteneciente a la subclase α-Proteobacteria (Giraldo, J. G, 2010). Se aisló de la vaina de la hoja de la caña de azúcar y de la cochinilla de la caña de azúcar de color rosa. Son bacterias aeróbicas, Gram (-), o Gram variables que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro o ácido. No hay una característica fenotípica exclusiva de la especie, pero la especie se puede distinguir fenotípicamente de los miembros estrechamente relacionados de las bacterias de ácido acético por el crecimiento en presencia de verde malaquita al 0,01%, el crecimiento de 30% en glucosa, una incapacidad para fijar nitrógeno y un incapacidad para crecer con los ácidos L-asparagina amino, glicina, glutamina, treonina y triptófano cuando D-manitol se suministró como única fuente de carbono y energía. Se destaca por su degradación bacteriana de celulosa y por ser un endófito en la caña de azúcar es decir que vive dentro de una planta por lo menos durante parte de su ciclo de vida sin causar enfermedad aparente. La cepa tipo de esta especie, es la cepa SRI 1794T (Franke *et al*., 2015, Restrepo, G. M. *et al* ,2017)

3.7 Antecedentes

Escobar, L. P. B., Ríos, D. M. F., Gómez, M. O., & Franco, M. 2016, Realizaron un estudio poniendo a prueba el método de criopreservación, durante 6 meses, utilizando 12 cepas de interés cafetero, para dar creación así dar creación a una colección de microrganismos en el SENA REGIONAL CALDAS, para la formación e investigación de sus estudiantes. Esto se encuentra en el artículo, Colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada en el centro para la formación cafetera SENA Regional Caldas (2016)

El método de conservación en agua destilada estéril es muy fácil y económico de usar, lo cual quedo demostrado en la investigación realizada por Pérez J, Casas M, Beltrán C. (2011), en donde el objetivo de su trabajo, fue la utilización del método en la conservación de diferentes géneros bacterianos (como Xanthomonas, Bradyrhizobium y Xynorhizobium) a temperatura ambiente y refrigeración por un periodo de tiempo establecido. Como resultados obtuvieron

que el método de agua destilada es un método de mediano plazo y es más efectivo en temperaturas ambiente. Con el empleo de este método, las cepas bacterianas se mantienen puras y sin alteración morfológica, es decir en estado de hipobiosis y los géneros bacterianos de la Colección del Microorganismos del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) con mayor supervivencia fueron Xanthomonas, Bradyrhizobium y Xynorhizobium con un 80 % de viabilidad.

Vibha B y Neelam G (2012) realizaron un análisis literario sobre la importancia de exploración de la biodiversidad microbiana por el hecho de que los microorganismos son esenciales para la vida ya que realizan numerosas funciones esenciales para la biosfera que incluyen el reciclaje de nutrientes y desintoxicación del ambiente. En este artículo de revisión exponen además la importancia de las anabiosis, el cual es un estado donde se frena el metabolismo de los microorganismos, utilizando diferentes métodos de conservación, entre los cuales podemos encontrar criopreservación, agua destilada, liofilización, secado y conservación en nitrógeno líquido. Y de esta forma mantener la estabilidad y viabilidad genética de los microorganismos conservados.

Franke J (2015) realizó un análisis sobre *Gluconacetobacter sacchari*, una nueva especie del genero Gluconacetobacter, la cual se destaca por su degradación bacteriana de celulosa y por ser un endófito en la caña de azúcar es decir que vive dentro de una planta por lo menos durante parte de su ciclo de vida sin causar enfermedad aparente y en este caso es la caña de azúcar. También se sabe que fue aislada de tomate y hace parte de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

El trabajo se basó en un estudio cuantitativo, experimental poniendo en análisis diferentes métodos de conservación, por periodos de tiempo establecidos; donde se evaluará cada uno de los métodos y se seleccionará el más viable para preservar la estabilidad bioquímica de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal almacenadas actualmente en la colección de microorganismos de la UCM.

4.2 Población y muestra

Los microorganismos a utilizados fueron bacterias del genero *Gluconacetobacter sacchari,* en sus dos cepas GIBI014 y GIBI031, las cuales son provenientes de cultivos caldenses de caña de azúcar y tomate, siendo aisladas de investigaciones anteriores y actualmente almacenadas en la colección de Microrganismo de la Universidad Católica de Manizales.

4.3 Procedimiento

4.3.1 ***Preparación de las muestras a conservar:***

Antes de realizar los debidos procedimientos para conservar las cepas en cada uno de los métodos, se debe realizar la reactivación de las mismas (Anexo 1), ya que estas cepas se encontraban conservadas en el freezer de -80ºC perteneciente a la colección de microorganismos de la UCM, y posteriormente realizar la recolección de la biomasa (Anexo 2), y por último ser conservadas en los 4 métodos respectivos.

4.3.2 ***Conservación de BPCVs por criopreservación a -80ºC.***

Posterior a la obtención de la biomasa (Anexo 2) se agregó glicerol al 10% a la biomasa recolectada, homogenizando en vortex y se dispenso 1 ml en tubos eppendorf de 2 ml, siendo estos almacenados en el freezer a -80°C, obteniendo 3 lotes de 9 viales cada uno.

4.3.3 ***Conservación de BPCVs por desecación sobre discos de papel filtro.***

Posterior a la obtención de la biomasa (Anexo 2), se agregó agua destilada estéril a la biomasa recolectada, homogenizando gracias al vortex y luego se adicionaron al homogenizado discos de 2 cm cada uno de papel filtro Whatman Nº 3, los cuales estaban debidamente esterilizados; luego se llevó a vortex durante 1 min, dejando en reposo durante 2 o 3 minutos; y por último, empleando pinzas estériles se depositaron los discos de papel filtro en cajas de Petri estériles, las cuales

fueron llevadas a un desecador con el fin de retirar la mayor cantidad de agua posible, y de esta manera ser almacenados en sobre de papel estériles a 4°C.

4.3.4 ***Conservación de BPCVs por suspensión en agua destilada estéril.***

Antes de realizar este método de conservación, se realizó la recolección de la biomasa (Anexo 2), y posterior a este procedimiento se agregó agua destilada estéril a la biomasa recolectada, homogenizando gracias al vortex y dispensando 1 ml de la suspensión en tubos eppendorf de 2 ml, hasta obtener 3 lotes de 9 viales cada uno, siendo estos almacenados a temperatura ambiente.

4.3.5 ***Preservación en aceite mineral***

Las dos cepas (GIBI014 y GIBI031) se sembraron en medio de cultivo PD en tubos pico de flauta (Anexo 3), luego se llevó a incubación a 30° C por 72 horas, y posterior a su crecimiento optimo, se añadió aceite mineral para cubrir todo el medio con la cepa; almacenándose a temperatura ambiente.

4.3.6 **Determinación de la capacidad de solubilización de fosforo*:***

Se determinó la capacidad de solubilización del fósforo por cada bacteria a las 24 horas y a los 3, 6, 9 y 12 meses de ser sometidas a conservación por los diferentes métodos. Para lo anterior se usó $Ca_3(PO4)_2$ insoluble en agar NBRIP (Anexo 3) Después de tener preparados los medios de cultivo, se inoculó 20 ul de la suspensión de cada una de las cepas conservadas, en 3 puntos del agar y se incubo a 30°C, midiendo el tamaño de las colonias y los halos a las 24, 48 y 72 horas después de incubación (Ramírez, L. C. C *et, al* 2014).

Para hallar el índice de solubilización (IS), se utilizó la siguiente formula:

$$IS = \frac{A}{B}$$

Formula 1 Índice de solubilización (IS) según Kumar y Narula, (1999).

Donde A, es el Diámetro Total (Diámetro de la colonia + Diámetro del halo) y B, es el Diámetro de la colonia.

4.3.7 **Prueba Viabilidad Celular*.***

Se considera como porcentaje de recuperación de 100% a lo obtenido en el primer repique efectuando a las 0 horas (antes de iniciar la conservación). Se determina la viabilidad de las bacterias antes y después de ser conservadas por los cuatro métodos a utilizar (crio preservación, suspensión en agua destilada, aceite mineral y desecación en papel filtro). Para esto se realizó diluciones seriadas en base 10 y siembras por superficie en agar PD (Anexo 3) de los inóculos antes de ser conservados y a las 24 horas, a los 3, 6, 9 y 12 meses post conservación el

número de células se expresan en UFC/ml de cultivo y el porcentaje de viabilidad celular se calculará usando la siguiente formula:

$$\%\, Viabilidad\ celular = \frac{UFC\ OBTENIDAS}{UFC\ INICILES} \times 100$$

Fórmula 2. Porcentaje de viabilidad celular

4.3.8 ***Análisis estadístico***

Después de transcurridos los periodos de tiempo, en donde se realizó la viabilidad y mediciones de los parámetros establecidos anteriormente, se dio paso a la realización del análisis estadístico utilizando el software R x64 3.4.3, con el cual se obtuvieron los resultados de los análisis.

5 RESULTADOS

5.1 Densidades ópticas de crecimiento bacteriano

Los resultados de las densidades ópticas de las cepas a conservar fueron los siguientes:

Tabla 1 Densidades Ópticas pre-conservación (λ 640nm)

Replica	Cepa GIBI014	Cepa GIBI031
1	0,941	0.942
2	0,360	1.122
3	1,061	1.067
4	0.956	0.449
5	1.007	1.035
6	1.036	0.939
7	0.977	1.046
8	0.467	1.001
9	0.395	1.024
10	1.031	1.108
11	1.013	1.104
12	1.103	1.096

5.2 Descripción macroscópica

Las características macroscópicas para *Gluconacetobacter sacchari* que se observaron fueron, colonias cremosas, con borde regular, convexas, pequeñas, brillantes, circulares, con un halo traslucido alrededor y de color café. Estas características son para las dos cepas (GiBI014 y GiBI031 los cuales hace referencia a *Gluconacetobacter sacchari*).

Sus tamaños fueron:

- GIBI014: 3.0 mm aproximadamente
- GIBI031: 2.5 mm aproximadamente

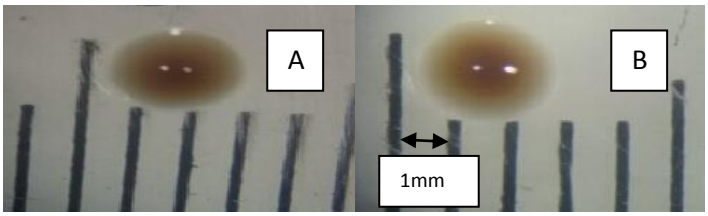


Figura 1. Descripción macroscópica de cepas *Gluconacetobacter sacchari*. A. GIBI014 y B. GIBI0031

5.3 Descripción microscópica

Se realizó tinción de Gram en el cual se observaron bacilos cortos Gram negativos. Lo cual hace referencia a la literatura consultada (Franke et al., 2015)

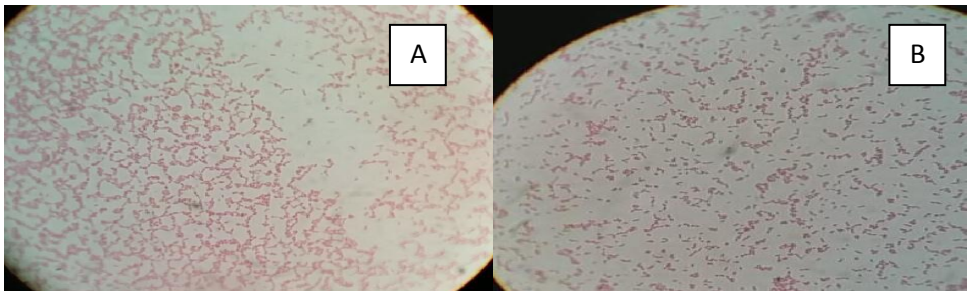


Figura 2 Descripción microscópica de cepas Gluconacetobacter sacchari. A. GIBI014 B. GIBI031.

5.4 Determinación de la viabilidad celular:

La prueba de viabilidad se llevó a cabo a las 24 horas, 3, 6, 9 y 12 meses post conservación, en donde en cada uno de estos periodos de tiempo se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (colonias con características cremosas, con borde regular, convexas, pequeñas, brillantes, circulares, con un halo traslucido alrededor y de color café), las cuales se obtenían a las 72 horas de incubación en agar PD.

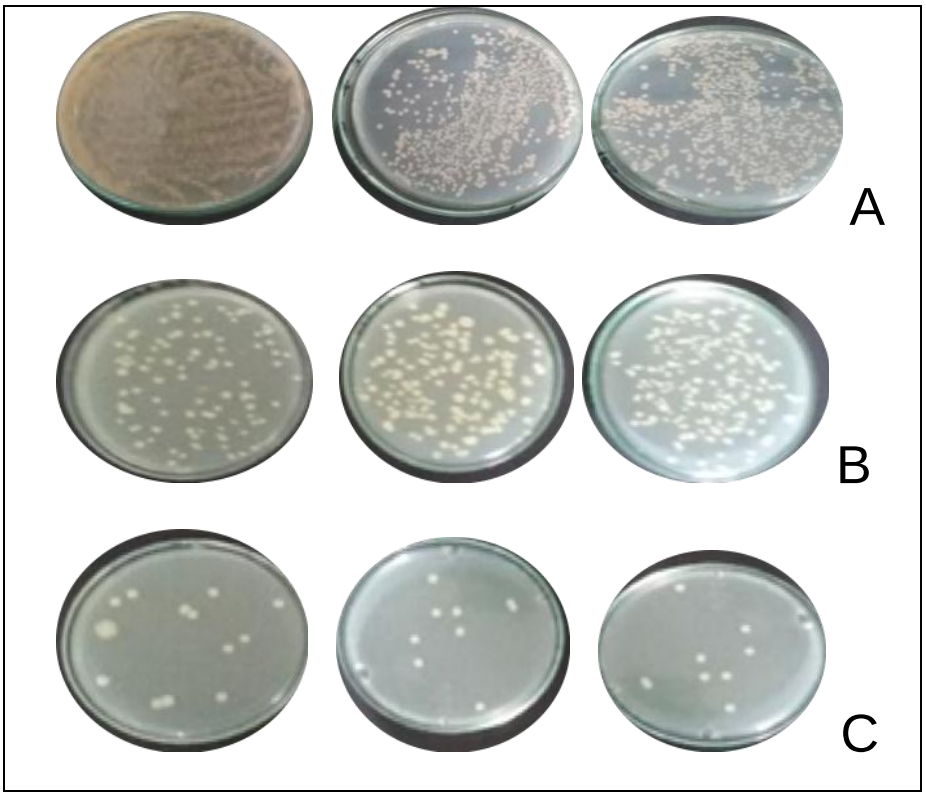
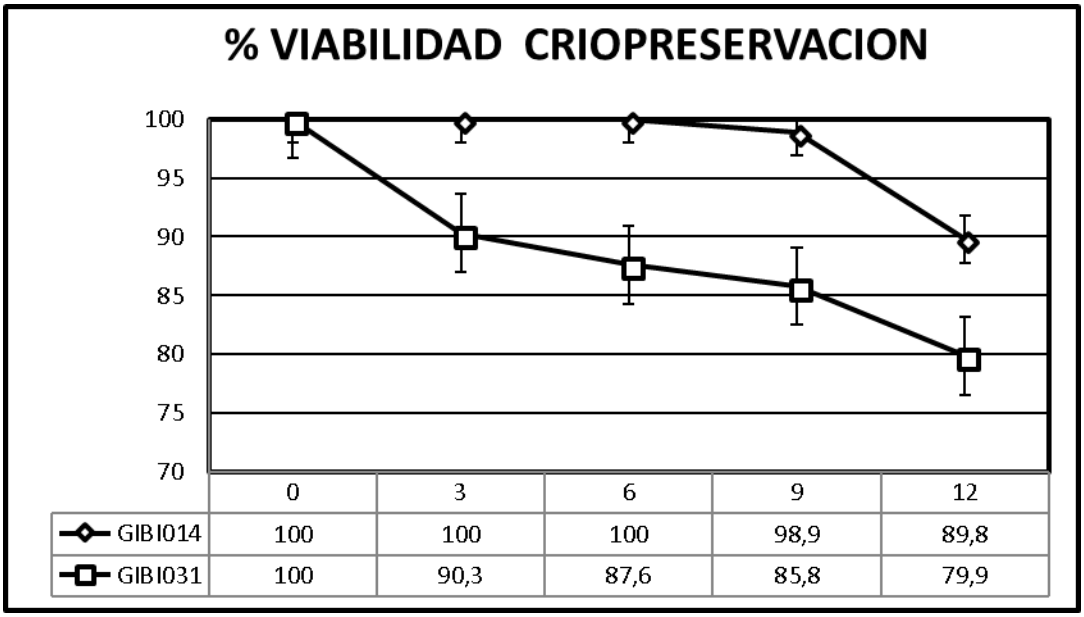


Figura 3 Determinación viabilidad celular. **A**. Método de Criopreservación. **B.** Método de Agua Destilada Estéril. **C.** Método de Papel Filtro

Al método de aceite mineral no se le realizo el recuento en placa, ya que las dos cepas (GIBI014 y GIBI031) fueron sembradas por agotamiento, tomando una colonia de la cepa conservada en aceite mineral, e inoculando en agar PD por medio de un asa bacteriológica. De esta manera se verifico la pureza de las cepas, observando y teniendo en cuenta sus características propias tanto macroscópicas (borde, color, textura, pigmentación) y microscópicas (tamaño, forma y coloración de Gram). Por tanto para este metodo no se aplico el porcentaje de viabilidad celular.

Figura 4 Determinación viabilidad celular. Método Aceite Mineral

5.5 Graficas porcentaje de viabilidad celular



	0	3	6	9	12
GIBI014	100	100	100	98,9	89,8
GIBI031	100	90,3	87,6	85,8	79,9

Figura 5 Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de criopreservación

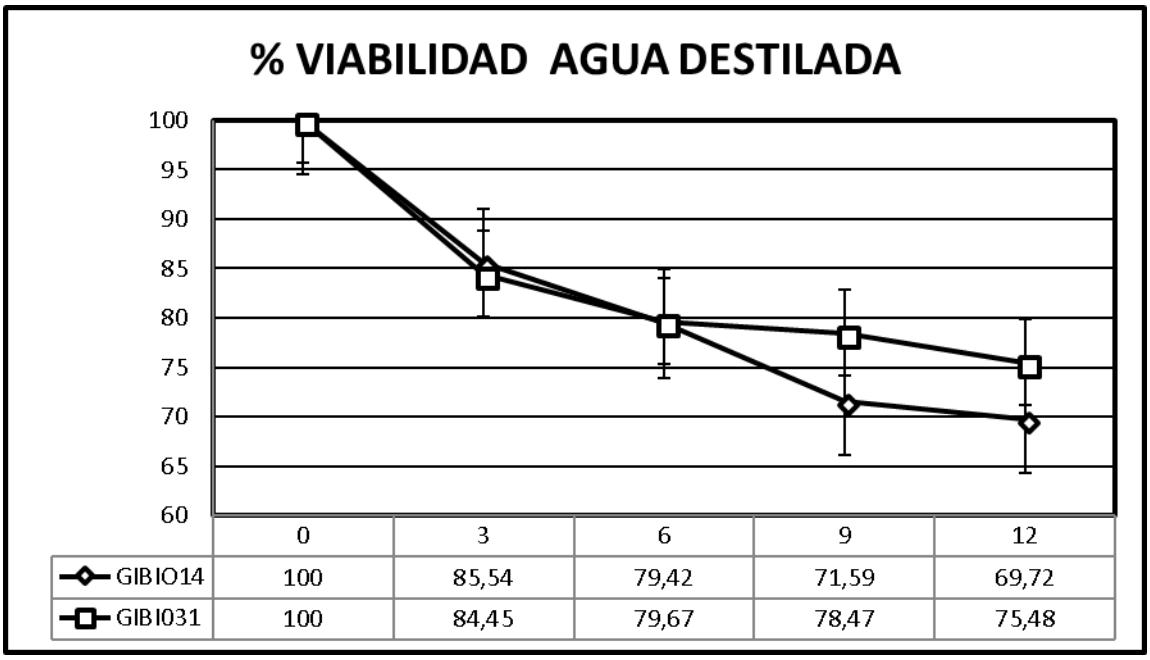


Figura 6 Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de agua destilada.

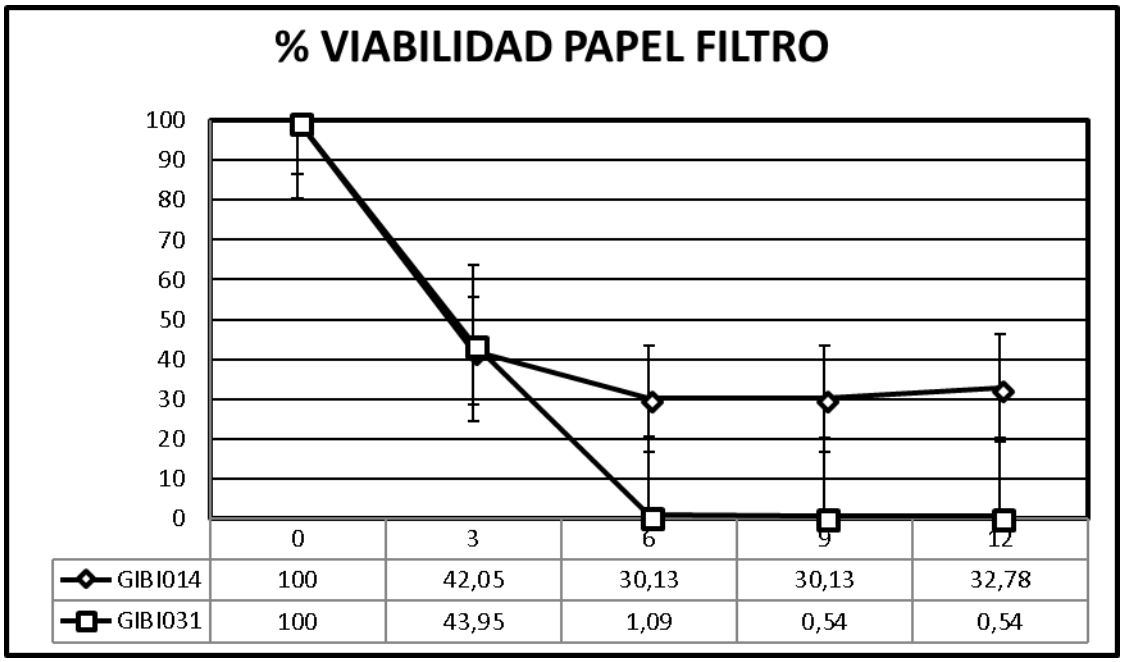
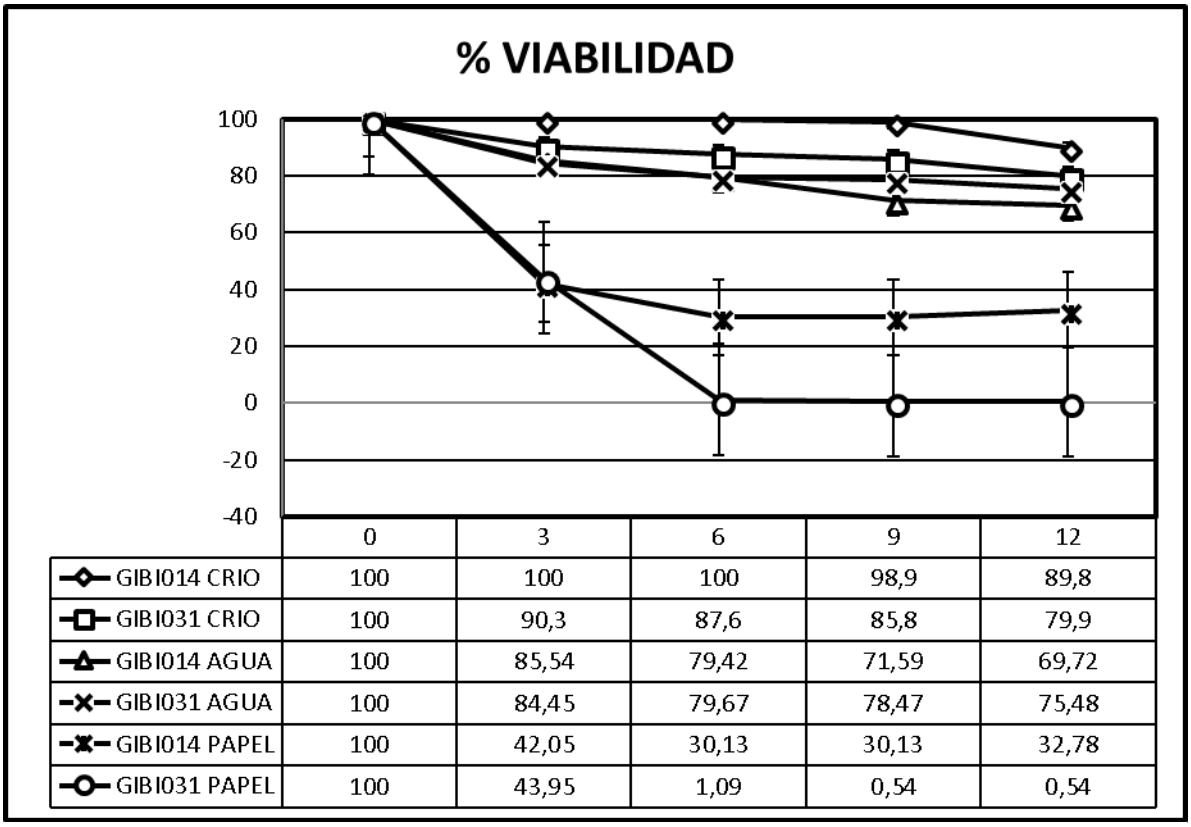


Figura 7. Porcentaje viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de papel filtro



	0	3	6	9	12
GIBI014 CRIO	100	100	100	98,9	89,8
GIBI031 CRIO	100	90,3	87,6	85,8	79,9
GIBI014 AGUA	100	85,54	79,42	71,59	69,72
GIBI031 AGUA	100	84,45	79,67	78,47	75,48
GIBI014 PAPEL	100	42,05	30,13	30,13	32,78
GIBI031 PAPEL	100	43,95	1,09	0,54	0,54

Figura 8. Grafica unificada de los porcentajes de viabilidad de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Métodos: criopreservación, agua destilada estéril y papel filtro

5.6 Determinación de la capacidad de solubilización de fosforo

La prueba de la solubilización en fosforo se llevó a cabo a las 24 horas, 3, 6, 9 y 12 meses post-conservación, en donde en cada uno de estos periodos de tiempo se midió el tamaño de los halos y las colonias producidas en el medio a las 24, 48 y 72 horas. Como dato relevante se observó que, en la lectura de las 72 horas, las cepas han logrado el 100% de solubilización con respecto al diámetro de la caja de Petri. A continuación, se mostrará evidencia fotográfica de las cepas en un método y tiempo de conservación determinado.

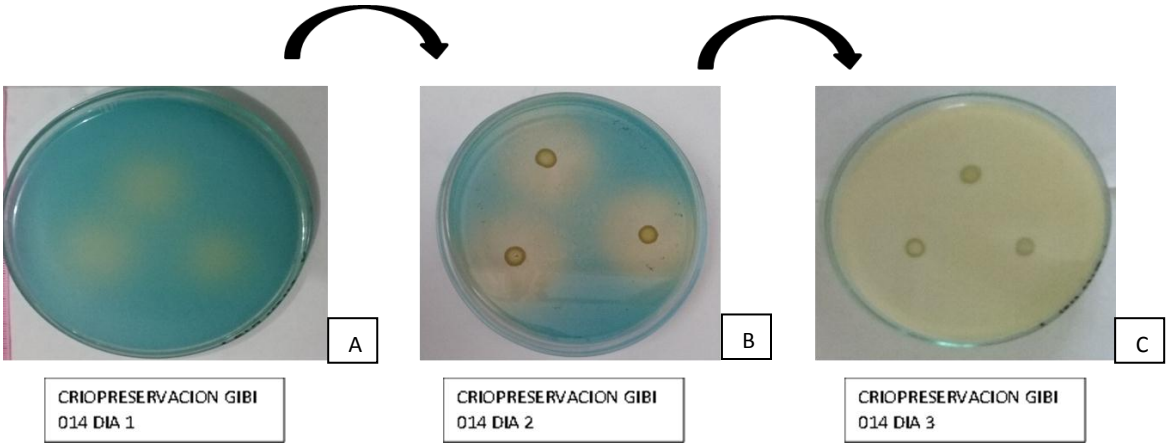


Figura 9. Prueba solubilización de fosforo en medio NBRIP, cepa GIBI014 A. Método de criopreservación a las 24 horas de incubación, cepa GIBI014. B. Método de criopreservación a las 48 horas de incubación, cepa GIBI014. C. Método de criopreservación a las 72 horas de incubación, cepa GIBI014.

5.7 Graficas de la prueba de solubilización de fósforo

Los resultados obtenidos son los siguientes, en cuanto a la eficiencia de solubilización de fosforo en el medio NBRIP:

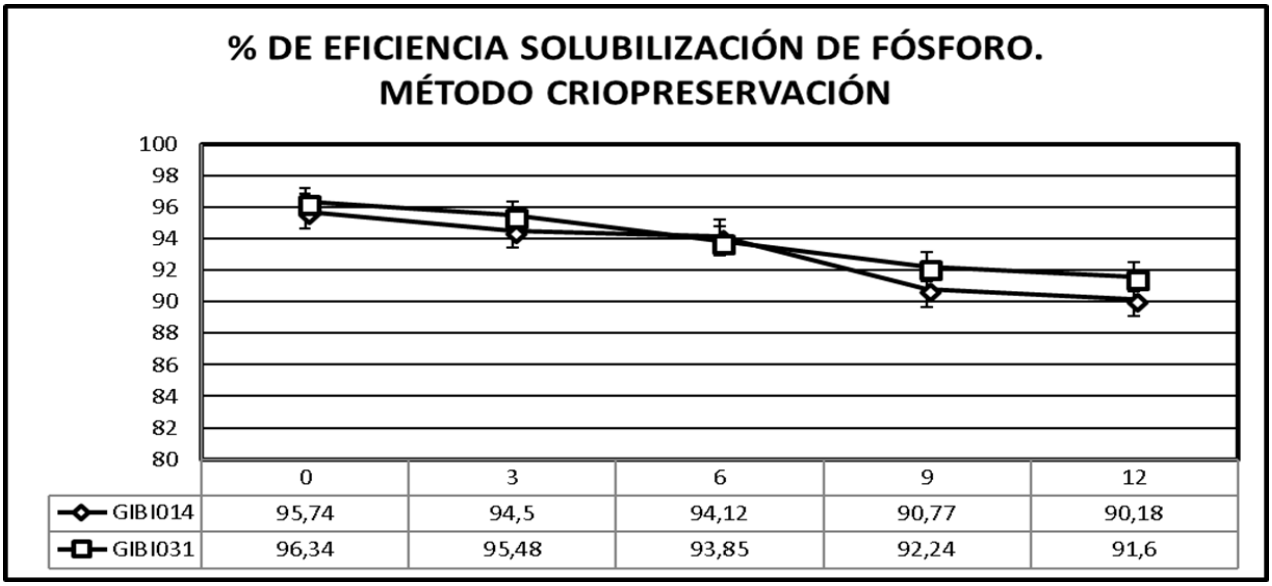


Figura 10. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de criopreservación.

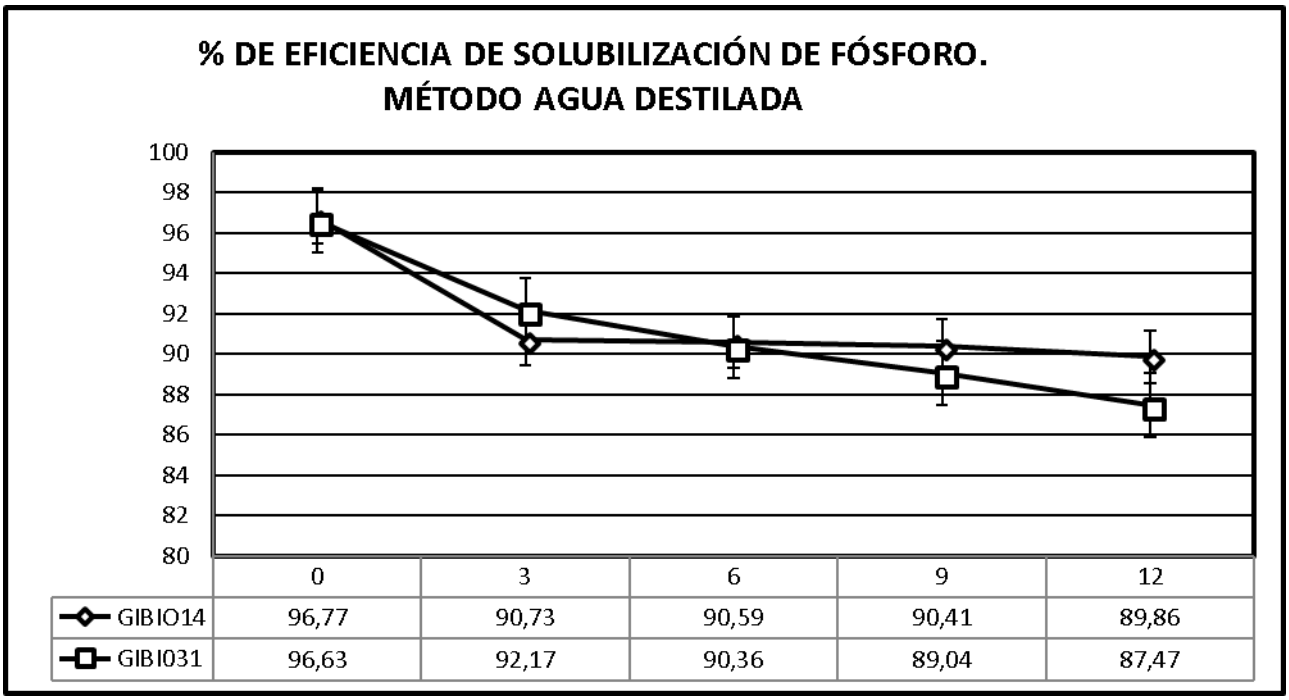


Figura 11. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de agua destilada

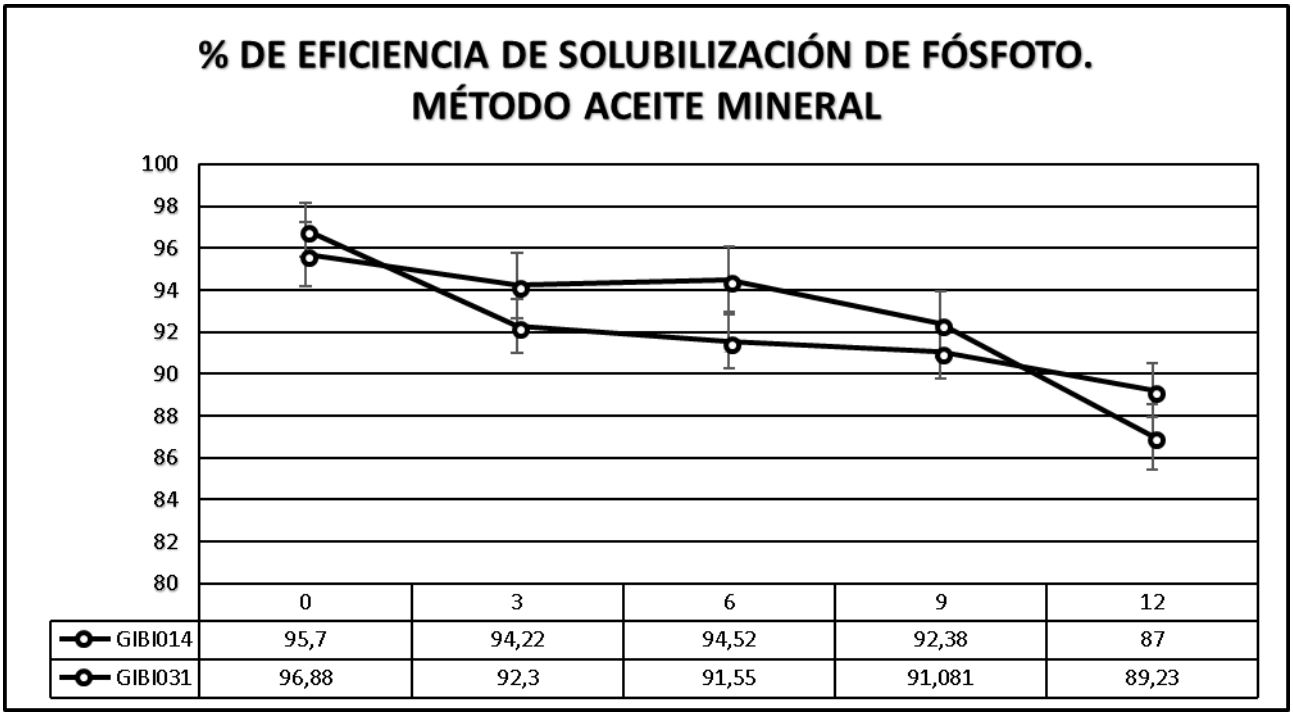


Figura 12. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de aceite mineral

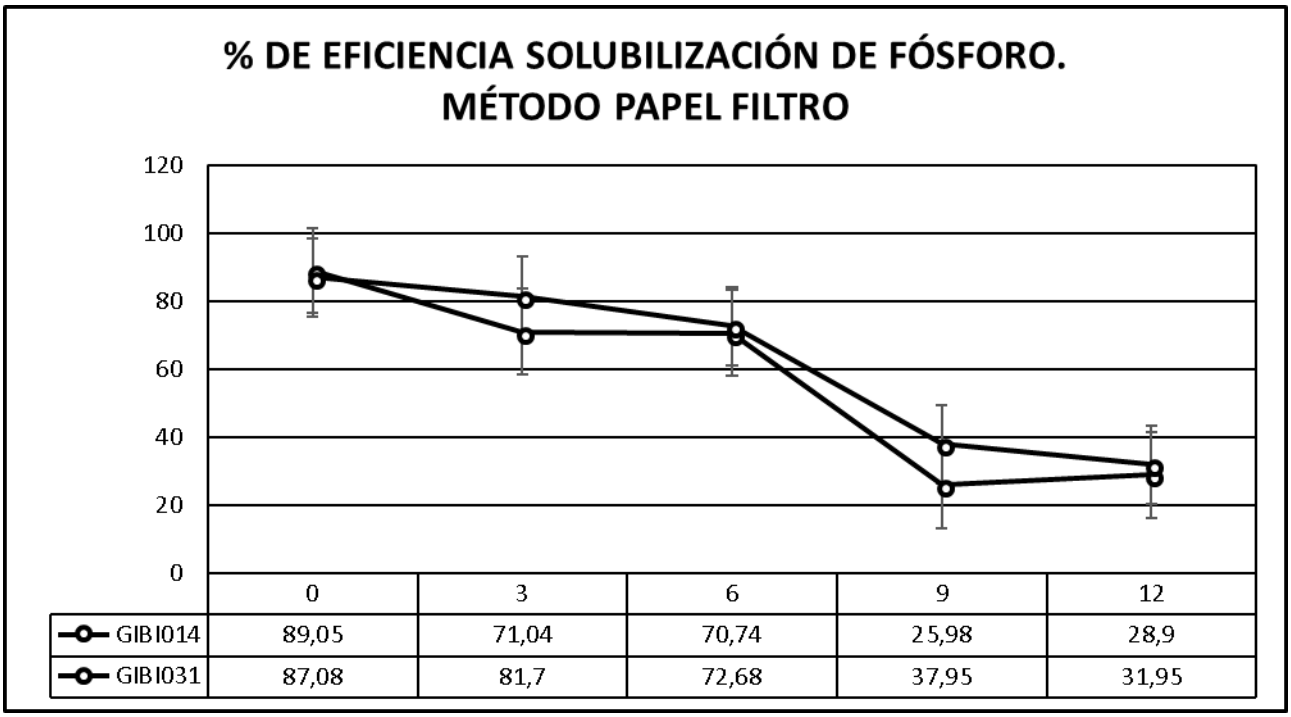


Figura 13. Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos de las cepas GIBI014 Y GIBI031 durante el tiempo de preservación. Método de aceite mineral

6 DISCUSIÓN

Es importante destacar como esta investigación partió del objetivo de identificar y determinar el mejor método de conservación, para garantizar la estabilidad bioquímica de *Gluconacetobacter sacchari*, almacenada en la colección de microrganismos de la UCM. Teniendo en cuenta que los microrganismos por fuera del ambiente natural (*ex situ*), requieren de unas condiciones óptimas, lo cual permite una adecuada reproducción. Con estos datos se definió el mejor método de conservación basándose en la estadística; donde cada una de las pruebas realizadas (solubilización de fosforo y viabilidad celular) tiene uno criterios de aceptación los cuales son, porcentaje de viabilidad >70% y un porcentaje de solubilización de fosfato tricálcico >85%. (Bobadilla Henao, C, *et. al*, 2008, Cuellar. C, 2018)

Teniendo en cuenta estos parámetros, se analizaron los diferentes ensayos que permitieron obtener los siguientes resultados.

6.1 Densidades ópticas de crecimiento bacteriano:

La densidad bacteriana se puede medir por varios métodos, uno de ellos es mediante la turbidez del medio de crecimiento en un espectrofotómetro midiendo el crecimiento de la masa celular, o determinando el número de individuos por unidad de área (Pérez *et al*., 2004; Romero, 2007). Según los resultados obtenidos en el estudio, con respecto al adecuado inoculo que cumpliera el criterio de aceptación (densidad optima entre 0.9-1.1 para obtener un concentración estándar de 10^8 células/ml.), la cepa GIBI014 obtuvo un promedio de 0.9 y la cepa GIBI031 obtuvo un promedio de 0.99 (tabla 1) en cuanto a la densidad optima real, lo cual expresa que las densidades están dentro del rango aceptado y se deduce que los microorganismos fueron cultivados en condiciones óptimas, teniendo siempre en cuenta criterios como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, el pH, el tiempo y los nutrientes necesarios , para este género bacteriano el cual se considera un microorganismo de lento crecimiento (crecimiento optimo , a las 72 horas de incubación). (Franke *et al*., 2015)

6.2 Descripción macroscópica y microscópica

Durante el transcurso del estudio se tuvo en cuenta, la morfología macroscópica de las cepas obtenidas en cada viabilidad, teniendo como resultado colonias características de la especie bacteriana, descritas en la literatura, colonias cremosas, con borde regular, convexas, pequeñas, brillantes, circulares, con un halo traslucido alrededor y de color café, además con un crecimiento optimo a las 72 horas de incubación, con morfología microscópica , de Bacilos cortos Gram Negativos (Franke *et al*., 2015), lo cual coincide y denota la no alteración de la morfológica bacteriana de las cepas tanto macroscópicamente como

microscópicamente, a través del tiempo y de los distintos métodos de conservación bacterianos utilizados en el estudio.

6.3 Reactivación de las cepas post-conservación

El procedimiento para la descongelación se realizó según lo planteado por Sánchez Leal y Corrales Ramírez, (2005): choque térmico a 37°C por 5 minutos en agitación constante y vortex para homogenizar. Este es un proceso sencillo, pero tiene grandes repercusiones si no se hace de manera adecuada y aún más si se trata de los crio-viales del método de criopreservación, debido a que se debe descongelar rápidamente para evitar la formación de cristales de hielo que pueden lisar la membrana de la célula, causando la disminución del porcentaje de viabilidad. Para el método de Agua destilada estéril, se resuspendió en los mismos viales utilizando vortex; para el caso del método en aceite mineral, con un asa estéril, se extrajo una colonia del tubo y se realizó una siembra por estría en medio APD y por ultimo para el método de papel filtro, se resuspendieron los papeles en una alícuota con agua destilada estéril y se llevó a vortex. El éxito de la reactivación celular, se evidencia en el crecimiento del agar PD.

6.4 Determinación de la viabilidad celular

La prueba de viabilidad celular se realizó en ciertos periodos de tiempo especificados anteriormente (a las 24 horas, 3, 6, 9 y 12 meses post conservación), los cuales son de gran importancia ya que la medición a las 24 horas se toma como el valor cero, siendo estas las UFC INICIALES, y de las cuales se parte para obtener el porcentaje de viabilidad de cada uno de los periodos y para cada una de las cepas analizadas, GIBI014 y GIBI031, según la fórmula 1.

6.4.1 Criopreservación:

Según Leibo & Pool (2011) el método de crio preservación se considera un método a largo plazo y uno de los más eficientes ya que permite mantener al menos el 70% de viabilidad de las cepas conservadas, afirmando lo anterior, se partió de las UFC INICIALES obtenidas por cada cepa (tabla 2 y 3), estos valores se toman como el 100% de viabilidad en el primer periodo de medición y analizando los valores obtenidos durante el tiempo de conservación se deduce que existen tanto diferencias entre las dos cepas como también en los periodos de medición, sin embargo, la cepa GIBI014 mantuvo el 100% hasta los 6 meses de medición, en el periodo de 9 meses descendió al 98,9% perdiendo tan solo el 1,1% y en el periodo de 12 meses obtuvo el 89,8 % perdiendo tan solo el 9, 1%, para un total de pérdida del 10,2% en el periodo de un año; por otra parte, la cepa GIBI031 descendió del 100% al 90,3% perdiendo el 9,7% en los primeros 3 meses de conservación, en el periodo de 6 meses obtuvo el 87,6% perdiendo el 2,7%, en el periodo de 9 meses obtuvo el 85,8%, perdiendo el 1,8% y en el mes 12 obtuvo el 79,9% perdiendo el 5,9%, para un total de perdida durante el año de conservación del 20,1%, lo anterior indica que la cepa GIBI014 obtuvo mejores resultados durante el tiempo de conservación con respecto a la cepa GIBI031, sin embargo este método cumplió con sus funciones en las cepas ya que durante el año de conservación se obtuvo más del 70% de viabilidad, por lo cual se deduce que en cuanto a la viabilidad celular el método de crio preservación es la mejor opción con respecto a los 3 métodos siguientes.

6.4.2 Agua destilada

Según Pérez J, Casas M, Beltrán C. (2011), el método de agua destilada es un método de mediano plazo y es más efectivo en temperaturas ambiente. Con el empleo de este método, las cepas bacterianas se mantienen puras y sin alteración morfológica, es decir en estado de hipobiosis. De acuerdo a lo anterior, el análisis del porcentaje de viabilidad celular para el método de agua destilada fue el siguiente, las UFC INICIALES obtenidas por cada cepa (tabla 1 y 2), se toman como el 100% de viabilidad en el primer periodo de medición, La cepa GIBI014 descendió del 100%, al 85,5 % perdiendo así el 14,5% en los 3 primeros meses de conservación, en el periodo de 6 meses descendió al 79,4% perdiendo tan solo el 6,1%, en el periodo de 9 meses descendió al 71,5% perdiendo el 8,9%, y en el periodo de 12 meses obtuvo el 69,7 % perdiendo el 1,8%, para un total de pérdida del 30,3% en el periodo de un año; por otra parte, la cepa GIBI031 descendió del 100% al 84,4% perdiendo el 15,6% en los primeros 3 meses de conservación, en

el periodo de 6 meses obtuvo el 79,6%, valor que se asemeja al porcentaje de los seis meses en la cepa GIBI014 perdiendo el 4,8%, en el periodo de 9 meses obtuvo el 78,4%, perdiendo el 1,2% y en el mes 12 obtuvo el 75,4% perdiendo el 3%, para un total de perdida durante el año de conservación del 24,6%; según los valores anteriores este método obtuvo valores similares durante el tiempo de conservación y entre las dos cepas, pero comparado con el método de crio preservación, su desempeño fue menor, sin embargo, este método se puede considerar como un método alternativo y a mediano plazo, para la conservación de *Gluconacetobacter sacchari,* ya que cumple con mantener la viabilidad celular del microorganismo.

6.4.3 Papel Filtro

A comparación de los demás métodos, este tuvo un desempeño bajo en cuanto a la viabilidad de *Gluconacetobacter sacchari,* esto se evidencia en el siguiente análisis de resultados. La cepa GIBI014 descendió del 100%, al 42,5% perdiendo así más de la mitad de la viabilidad en tan solo los 3 primeros meses de conservación y quedando descartado dentro de los métodos desde la primera estancia ya que no cumplió con el 70% esperado; en el periodo de 6, 9 y 12 meses perdió aproximadamente el 12,5% para un total de pérdida del 69,9% en el periodo de un año, cifra que debió mantener a cambio de perder, por otra parte, la cepa GIBI031 descendió del 100%, al 43,9% perdiendo así más de la mitad del porcentaje en tan solo los 3 primeros meses de conservación; en el periodo de 6 meses siguió descendiendo de manera significativa, obteniendo el 1,09% y perdiendo casi todo su porcentaje; en los periodos 9 y 12 meses siguió disminuyendo hasta obtener 0,54% valor totalmente ineficiente, para un total de pérdida del 99,46%, lo que afirma que este método no es apto para este microorganismo, ni se podría tomar como un opción alternativa, aunque la literatura expresa que este método funciona para diferentes especies bacterianas (Duque, *et al*. 2012).

6.4.4 Aceite Mineral:

Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Los cultivos pueden mantenerse por varios años (D, Rodríguez. Y, Gato, 2010)(Nakasone *et al*., 2004), lo anterior se afirma con los resultados obtenidos, ya que durante los periodos de conservación, se obtuvieron siembras puras del microorganismo, las cuales cumplían con las características macroscópicas y microscópicas propias de *Gluconacetobacter sacchari* (colonias cremosas, con borde regular, convexas, pequeñas, brillantes, circulares, con un halo traslucido alrededor y de color café, además crecimiento optimo a las 72 horas de incubación, con morfología microscópica , de Bacilos Gram Negativos (Franke *et al*., 2015)), determinando así que en cuanto a este parámetro el método se podría tomar como alternativa de

conservación en caso de no poseer los métodos de crio preservación y de agua destilada, además no posee procedimientos rigurosos y funciona a temperatura ambiente.

6.5 Prueba de solubilización de fosforo

6.5.1 Criopreservacion:

Con respecto a los resultados obtenidos durante el año de conservación, se evidencia que las cepas GIBI014 y GIBI031, manifestaron un comportamiento similar en su capacidad intrínseca de solubilizar el fosforo, evidenciándose en los valores obtenidos en el tiempo momento de medir la viabilidad a las 24 horas después de la conservación (figura 5); GIBI014 obtuvo el 95,74% y GIBI031 96,34%; y a medida de que transcurrieron los periodos de medición las cepas disminuyeron un poco su capacidad de solubilización, en el caso de GIBI014, disminuyo el 5,56%, obteniendo como resultado final de la conservación el 90,18%; por otra parte la cepa GIBI031 disminuyo el 4,74%, obteniendo como resultado al final del año de conservación el 91,6%. Sin embargo, los resultados obtenidos cumplen con lo estipulado, es decir el porcentaje de solubilización es mayor a 85% en cada una de las mediciones y a terminar el año de conservación.

6.5.2 Agua destilada:

Los resultados obtenidos para el método de agua destilada estéril, fueron muy eficientes, ya que cumplieron con lo estipulado por (B, Bobadilla Henao, C., *et al* 2008, Cuellar. C., 2018), es decir más de 85% de solubilización de fósfatos, y al terminar con el periodo de conservación estos resultados se mantuvieron, perdiendo tan solo el 6,91% de capacidad solubilizadora para la cepa GIBI014 y el 9,16 % para la cepa GIBI031 (figura 6), por lo cual se deduce que este método de conservación es eficiente y se puede tomar como alternativa para conservar el microorganismo.

6.5.3 Aceite Mineral:

Este método de conservación obtuvo resultados similares con respecto al método de agua destilada, ya que en cuanto a las dos cepas y a los resultados obtenidos en la medición inicial, los dos métodos obtuvieron valores cercanos e iguales al 96% y con respecto al último periodo de medición, los valores estuvieron entre el 89-87% (figura 7), esto confirma la eficiencia del método, garantizando la

conservación de una de las características intrínsecas de *Gluconacetobacter sacchari,* como lo es la solubilización de fosfatos.

6.5.4 Papel Filtro:

Este método de conservación obtuvo valores deficientes con respecto a los demás métodos, y con lo descrito por (Bobadilla Henao, C., *et al* 2008, Cuellar C 2018), ya que los valores cero, son resultados coherentes, que cumplen con lo estipulado, (GIBI014: 89,05% y GIBI031:87,08%) (figura 8), pero estos porcentajes van disminuyendo, desde los 3 meses, y a medida que de que transcurren los periodos de análisis, obteniendo como resultados finales para la cepa GIBI014 solo el 28,9% y para la cepa GIBI031 el 31,95%; valores muy deficientes e inaceptables para el microorganismo, ya que esto indica la perdida de una de sus características más importante a nivel agroindustrial.

Comparando los diferentes métodos de conservación durante el tiempo establecido, se puede llegar a la conclusión de que el método de criopreservacion obtuvó porcentajes mayores en cuanto a la capacidad de solubilizar el fosforo, en las dos cepas analizadas, sin embargo los métodos de aceite mineral y agua destilada, obtuvieron resultados óptimos y similares; ya que todos los métodos mencionados anteriormente cumplieron con el valor estándar que es mayor a 85% de capacidad solubilizadora (Bobadilla Henao, C., *et al* 2008), lo cual indica que estos métodos de conservación son apropiados para la conservación de este tipo de microorganismo considerado promotor de crecimiento vegetal, el cual contribuye a alternativas biológicas que mejoran notablemente el rendimiento de las cosechas y garantizan la protección del medio ambiente. (Ramírez, L. C. C *et. al*, 2014).

6.6 Índice de Solubilización de fosfatos:

El índice de solubilización es una medida expresada en milímetros (mm), que nos indica el radio de solubilización total que obtuvo cada una de las cepas, en los métodos y tiempos determinados de análisis. (Restrepo, G. M. *et al* ,2017) En este caso el método de criopreservacion obtuvo el índice de solubilizarían más alto, en las dos cepas conservadas (Tabla 1 y 2) manteniendo un promedio de 105,2 mm +/- 6,3 (GIBI014) y 106,4 mm +/- 13,0 (GIBI031); estos datos confirman la eficiencia en la conservación de las características bioquímicas de las bacterias con el método, medidas no solo en porcentaje de solubilización si no como índice total del mismo. Los métodos de agua destilada (GIBI014: 87,2 mm +/- 3,1 y GIBI031: 87,8 mm +/- 1,3) y aceite mineral (GIBI014: 64 mm +/- 6,8 y GIBI031: 68 mm +/- 2,3) obtuvieron valores más bajos, comparados con los del método de

criopreservacion. Sin embargo, el método de papel filtro (GIBI014: y GIBI031: 11,6 mm +/- 10,6) obtuvo desde la medición cero un índice bajo, el cual fue decayendo cada vez más durante el transcurso del ensayo y dejando una vez más claro el no funcionamiento de éste método para *Gluconacetobacter sacchari.*

7 CONCLUSIONES

Mediante la comparación de los métodos de conservación empleados en el proyecto de investigación, y analizando los resultados de las pruebas realizadas, que fueron el porcentaje de viabilidad celular y el porcentaje de solubilización de fosforo, se llegó a la conclusión de que el método de críopreservacion es el método más eficiente y adecuado para conservar la estabilidad bioquímica de *Guconacetobacter sacchari* ya que en las dos pruebas obtuvo mayores porcentajes de viabilidad y solubilización de fosfato comparado con los demás métodos. Esto indica que se pueden tomar como elección en futuras preservaciones de este microorganismo, ya que este es un método de anabiosis, que no requiere manipulación constante, es de fácil uso y además garantiza su utilización para la preservación de microorganismos por periodos prolongados de tiempo. Las dos cepas, cumplieron con el objetivo, de garantizar mas de 70% de viabilidad y más de 85% de solubilización de fosforo durante los 12 meses de conservación.

En cuanto a los métodos de agua destilada estéril y aceite mineral, se concluye que estos métodos pueden ser utilizados como alternativa, en el caso de no contar con los recursos, materiales y metodología requerida por el método de ciopreservacion, ya que al ser métodos de hipobiosis, limitan el metabolismo microbiano, pero no lo detienen completamente, sin embargo, cumplen con lo estipulado, acerca de los porcentajes de viabilidad y solubilización de fósforo.

El método de papel filtro no funcionó, este método no conservo las células, ya que tuvo baja viabilidad desde el primer trimestre de la conservación, y obteniendo como resultado a los 12 meses de medición valores por debajo de estipulado. Este es considerado un método de hipobiosis, es decir disminuye la actividad metabólica del microorganismo y en este caso esta podría ser la causa del no funcionamiento del mismo, ya que el microorganismo tuvo una proliferación constante que lo llevo a la nula viabilidad celular de las dos cepas.

En conclusión, el método de criopreservación, es el método más recomendable, que puede mantener estable la bacteria *Gluconacetobacter sacchari* tanto fisiológica como bioquímicamente, ya que mantuvo las dos cepas viables, con resultados por encima de los criterios de aceptación. Por lo tanto, se recomienda la utilización de este método para conservar los microorganismos de estas especie, la cual es de importancia industrial en la colección de Microorganismos de la UCM

8 RECOMENDACIONES

.

- Se podría considerar el uso de crioprotectores diferentes al glicerol, como una buena alternativa para demostrar cuál de ellos ayuda a mantener las células sin daño alguno durante la criopreservación. El DimetilSulfoxido, se puede tomar como opción, ya que es un crioprotector intracelular con funciones similares a las de glicerol, y de esta manera aumentar el porcentaje de viabilidad en las células.
- No usar el método de papel filtro para futuras conservaciones de *Gluconacetobacter sacchari,* o se debe revisar y ajustar la técnica según las condiciones necesarias y adecuadas para que el microorganismo, posea una viabilidad aceptable y mantenga las características intrínsecas de importancia industrial.
- Investigar y tratar de implantar nuevos métodos de congelación analizando, los costos, la infraestructura y el personal, para determinar si es viable su uso en la UCM. Dentro de estos métodos se puede considerar la liofilización o criopreservación en nitrógeno líquido, los cuales se consideran metodologías a largo plazo, que garantizan la viabilidad de las cepas conservadas.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1. Procedimiento de reactivación de las cepas

1. Seleccionar los crio viales con las cepas GIBI014 y GIBI031 del freezer a –80° C.
2. Llevar al termomixer los crio viales por 5 minutos a 37°C y de esta manera generar un choque térmico.
3. Inocular empleando la técnica de agotamiento en medio de cultivo PD (Agar Papa Dextrosa, previamente preparado).
4. Identificar los medios de cultivo a utilizar con el nombre de la persona que realizo el procedimiento, fecha, número de cepa y método de conservación almacenada la cepa. Nota: Si no se presenta crecimiento en el medio de cultivo PD, se debe realizar siembra en caldo DYGS.
5. Llevar a incubación por 72 horas a 30°C, verificando constantemente el crecimiento de la cepa, con sus características propias.
6. Posterior al crecimiento optimo obtenido en el medio de cultivo PD, se inoculo una colonia de crecimiento mencionado en un medio de cultivo líquido, el cual fue caldo DYGS, realizando 2 réplicas por cada crecimiento y llevando a incubar con constante agitación a 30°C por 72 horas.
7. Posterior al crecimiento en este medio líquido mencionado, se sembró de nuevo en caldo DYGS, dispensando el inoculo anterior en cantidades iguales, pero esta vez obteniendo 12 réplicas por cada cepa.
8. Luego de realizar este proceso de siembra, se llevó a incubar a 30°C en constante agitación (150rpm) por 72 horas.

9.2 Anexo 2. Procedimiento de recolección de la biomasa

1. Posterior a obtener un crecimiento optimo en las 12 réplicas, inoculadas en caldo DYGS se midió la densidad optima a una longitud de onda de OD640 nm, lo cual es equivalente 0.9-1.0 para obtener una concentración estándar de 10^8 células/ml; utilizando un espectrofotómetro.
2. Luego de haber obtenido una densidad optima adecuada se dio paso a la recolección de la biomasa la cual consiste de 3 pasos:
3. Centrifugación máxima a 4000 rpm x 45 minutos
4. Agregar agua destilada estéril (5 ml) y agitar en vortex para diluir el botón de células
5. Nuevamente centrifugar x 20 min a la máxima velocidad de la centrifuga

9.3 Anexo 3. Preparación de medios de cultivo

*9.3.1 **Agar PD***

Fueron preparadas 168 medios de cultivo, donde cada una de las cajas contenía 8 ml de mismo.

1000 ml → 39 g = 131.040 g
3360 ml → x

9.3.2 ***Preparación Agar NBRIP***

Fueron preparadas 96 cajas del medio, cada una con 20 ml, para un total de 1920 ml.

Componentes.	Para 1 Litro.	Fórmula.	Para 1920ml
Glucosa:	10g	1000ml → 10g 1920ml → X	0,8g
MgCl2 6H2O	5g	1000ml → 5g 1920ml → X	0,8g
MgSO4 7 H2O:	0.25g	1000ml → 0.25g 1920 → X	0,6g
KCl	0.2g	1000ml → 0.2g 1920 → X	0,8g
(NH4)2SO4	0.1g	1000ml → 0.1g 1920ml → X	0,2g
Verde de bromocresol	0.02g	1000ml → 0.02g 1920ml → X	0,2g
Fosfato tricálcico	5g	1000ml → 5g 1920ml → X	0,6g
Agar Bacteriológico	12 g	1000ml → 12g 1920ml → X	23.04 g

9.3.3 ***Preparación caldo DYGS***

Para preparar este insumo se deben tener en cuenta las siguientes cantidades para un litro del mismo:

Componentes.	Para 1 Litro.	Fórmula.	Para 400ml
Glucosa:	2g	1000ml → 2g 400ml → X	0,8g
Ácido Málico:	2g	1000ml → 2g 400ml → X	0,8g
Peptona Bacteriológica:	1.5g	1000ml → 1.5g 400ml → X	0,6g
Extracto de levadura.	2g	1000ml → 2g 400ml → X	0,8g

K_2HPO_4	0.5g	1000ml → 0.5g 400ml → X	0,2g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5g	1000ml → 0.5g 400ml → X	0,2g
Ácido glutámico.	1.5g	1000ml → 1.5g 400ml → X	0,6g

Luego de tener las cantidades específicas de cada uno de los componentes del medio de cultivo se debe ajustar el pH con NaOH hasta 5,8 – 6,0 y el pH final después de la autoclave es de 7.
Preparación de medios de cultivo APD (Agar Papa Dextrosa).
Preparación de 25 cajas de Petri en cada una de ellas se agregan 8 ml de agar.

1000 ml → 2 g = 3,12 g
400 ml → x

9.3.4 Tabla 2. UFC obtenidas los diferentes periodos de tiempo post-conservacion en medio APD. Cepa GIBI014

GIBI014	UFC INICIALES (UFC/ml)	UFC INICIALES (UFC/ml)	% de Viabilidad celular
Crio- 0	10 ×10^8	10×10^8	100
Crio- 3	10 ×10^8	10 ×10^8	100
Crio- 6	10 ×10^8	10 ×10^8	100
Crio-9	98×10^7	10 ×10^8	98,5
Crio-12	89×10^7	10 ×10^8	89,8
Agua D-0	58×10^7	58×10^7	100
Agua D-3	50×10^7	58×10^7	85,54
Agua D-6	47×10^7	58×10^7	79,42
Agua D-9	42×10^7	58×10^7	71,59
Agua D-12	41×10^7	58×10^7	69,72
Papel F-0	30×10^7	30×10^7	100

Papel F-3	13×10^7	30×10^7	42,05
Papel F-6	91×10^6	30×10^7	30,13
Papel F-9	91×10^6	30×10^7	30,13
Papel F-12	99×10^6	30×10^7	32,78

9.3.5 Tabla 3. UFC obtenidas los diferentes periodos de tiempo post-conservacion en medio APD. Cepa GIBI031

GIBI031	UFC INICIALES (UFC/ml)	UFC INICIALES (UFC/ml)	% de Viabilidad celular
Crio- 0	10 ×10^8	10×10^8	100
Crio- 3	90 ×10^7	10 ×10^8	90,3
Crio- 6	88 ×10^7	10 ×10^8	87,6
Crio-9	86×10^7	10 ×10^8	85,8
Crio-12	80×10^7	10 ×10^8	79,9
Agua D-0	67×10^7	67×10^7	100
Agua D-3	57×10^7	67×10^7	84,45
Agua D-6	53×10^7	67×10^7	79,67
Agua D-9	52×10^7	67×10^7	78,43
Agua D-12	50×10^7	67×10^7	75,48
Papel F-0	18×10^7	18×10^7	100
Papel F-3	80×10^6	18×10^7	43,95
Papel F-6	20×10^5	18×10^7	1,09
Papel F-9	10×10^5	18×10^7	0,54
Papel F-12	10×10^5	18×10^7	0,54

9.3.6 ***Tabla 4**. Índice de solubilización obtenidos en los diferentes métodos y periodos de tiempo post-conservación. Cepa GIBI014*

Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI014	crio- 0	116
	crio-3	102
	crio- 6	101
	crio- 9	106
	crio -12	101
Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI014	agua d-0	91
	agua d-3	85
	agua d-6	83
	agua d-9	88
	agua d-12	89

Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI014	aceite-0	74
	aceite-3	55
	aceite -6	65
	aceite-9	64
	aceite-12	62
Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI014	p filtro-0	35
	p filtro-3	10
	p filtro -6	7
	p filtro-9	3
	p filtro-12	3

9.3.7 *Tabla 5. Índice de solubilización obtenidos en los diferentes métodos y periodos de tiempo post-conservación. Cepa GIBI031.*

Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI031	crio- 0	129
	crio-3	106
	crio- 6	99
	crio- 9	98
	crio -12	100
Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI031	agua d-0	89
	agua d-3	89
	agua d-6	86
	agua d-9	88
	agua d-12	87

Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI031	aceite-0	69
	aceite-3	64
	aceite -6	68
	aceite-9	69
	aceite-12	70
Cepa	Metodo	IS (mm)
GIBI031	p filtro-0	30
	p filtro-3	11
	p filtro -6	8
	p filtro-9	5
	p filtro-12	4

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PJ blanco, Brown PH (2010). nutrición de las plantas para el desarrollo sostenible y la salud mundial. Ana. Larva del moscardón. 105: 1073-1080. Yamada Y, Yukphan P (2008). Géneros y especies en ácido acético las bacterias. En t. J. Microbiol Alimentos. 125: 15-24.

Escobar, L. P. B., Ríos, D. M. F., Gómez, M. O., & Franco, M. (2016). Colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada en el centro para la formación cafetera SENA Regional Caldas. Revista Nova, 2(1), 8-15.

CANO, D. H. S. A. S. L. (2014). Selección De Un Método Para La Conservación Y Preservación De Actinomicetos Aislados Del Suelo Del Jardín Botánico De La Universidad Tecnológica De Pereira. *Universidad Tecnológica De Pereira*, (1), 1–5. http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. La Habana, Cuba: Finlay.

García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. Act SEM. 2005; 30:12-6

Dayamí Rodríguez Batista y Yohana Gato (2010) Cárdenas. MÉTODOS ALTERNATIVOS EN LA CONSERVACIÓN DE TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI. FITOSANIDAD vol. 14, no. 4, December 2010, pp. 241-246.

Nakasone, K. K., Peterson, S. W., Jong, S-C. 2004. Preservation and distribution of Fungal cultures. Biodiversity of Fungi. pp. 37-47.

WSI Consultoría Digital. Elección de la técnica adecuada. Metrix Laboratorios (2015) doi: http://www.metrixlab.mx/no-cat/preservacion-de-microorganismos/

Vibha B, Neelam G. Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. Vol. 1(3), 78-83, July (2012). Department of Microbiology, Kurukshetra University Kurukshetra, Haryana, INDIA.

Weng Z. (2005) Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel, Ciudad de La Habana, Cuba.

Restrepo, G. M., Sanchez, O. J., Marulanda, S. M., Galeano, N. F., & Taborda, G. (2017). Evaluation of plant-growth promoting properties of Gluconacetobacter diazotrophicus and Gluconacetobacter sacchari isolated from sugarcane and

tomato in West Central region of Colombia. African Journal of Biotechnology, 16(30), 1619-1629.

Ramírez, L. C. C., Galvez, Z. Y. A., & Burbano, V. E. M. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. Nova, 12(21).

Bobadilla Henao, C., & Rincón Vanegas, S. C. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).

Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *12*(2).

Restrepo-franco GM, Marulanda-moreno S, Fe-Pérez Y De. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. UCM. 2015;2–15.

Torriente, D. (2010). Revisión bibliográfica APLICACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZUCAR. PERSPECTIVAS DE SU USO EN CUBA. *Cultivos Tropicales*, *31*(1), 19–26.

E, Nazarena (2015) Caracterización de bacterias endófitas asociadas a variedades de arroz (oryza sativa) y su comportamiento frente a BPCV. Tesis en Licenciatura en Ciencias Biologicas. Montevideo, Uruguay.

Giraldo, J. G. (2010). EVALUACIÓN DE DIFERENTES METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO DE LA BACTERIA ENDÓFITA Gluconacetobacter spp. A PARTIR DE CULTIVOS DE CAÑA DE AZÚCAR PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE SUPÍA (CALDAS), 46

Pérez J, Casas M, Beltrán C. (2011) Conservación de bacterias por el método de suspensión en agua destilada estéril. Instituto Nacional de Investigaciones de la caña de azúcar (INICA).

Cuellar, C (2018). ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE LA BACTERIA Gluconacetobacter diazotrophicus CONSERVADA POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE PRESERVACION. Grupo de Investigaciones Biologicas. SIBIO. Universidad Catolica de Manizales.

Bashan, Y. y Holguin, G. Proposal for the division of Plant GrowthPromoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-BPCV (Plant Growth-Promoting Bacteria) and BPCV. Soil Biol. Biochem., 1998, vol. 30, no. 8-9, p. 1225-1228

Matiru, V. N. y Dakora, F. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African Journal of Biotechnology, 2004, vol. 3, p. 1-7

Martín, C, Cervera, M.T.& González-Benito, M. E. (2011). Genetic stability analysis of chrysanthemum (Chrysanthemum x morifolium Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservación protocol. Joumal of Plant Physiology, 168(2), 158-166. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/i.soilbio.2010.06.025

Uzunova, T., & Donev, T. (2004) ANABIOSIS AND CONSERVATION OF MICROORGANISMS. JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS, 417-28.

García de Salamone, I.E., J. Dobereiner, S. Urquiaga, y R.M. Boddey. 1996. Biological Nitrogen Fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the 15N isotope dilution technique. Biol. & Fertil. Soils 23: 249-256.

Döbereiner, J. y J.M. Day. 1975. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. pp. 39-56. In: Stewart, W.D.P. (ed.). Nitrogen fixation by free-living microorganisms. International Biological Prog. Cambridge University Press. Cambridge, UK

Rodríguez M., M.N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. pp. 105-126. In: Ferrera-Cerrato R. y J. Pérez M. (eds.). Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.

Kloepper, J. W. Plant growthpromoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. F. B. Metting, Jr., ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1993. 274 p.

Franke I H, Fegan M, Hayward C, Leonard G, Stackebrandt E and Sly L I (2015) Description of Gluconacetobacter sacchari sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1681-1693

Percival Zhang, Y. H., M. E. Himmel and J. R. Mielenz (2006). "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies." Biotechnology Advances **24**(5): 452-481.

Shah, S.; Li, J.; Moffatt, B. A. y Glick, B. R. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 1998, vol. 44, p. 833-843.

Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., … & de Bashan, L. G. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México*, *29*(2), 201-211.