

**DOCUMENTACION DE UN SISTEMA PARA EL MANEJO Y
CONSERVACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS EN EL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA EMPRESA AVÍCOLA EN
SANTANDER.**

**LILIANA MARGARITA VEGA TORO
TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
Pamplona, 2020**

**DOCUMENTACION DE UN SISTEMA PARA EL MANEJO Y
CONSERVACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS EN EL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA EMPRESA AVÍCOLA EN
SANTANDER.**

**LILIANA MARGARITA VEGA TORO
TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGO**

**TUTOR EMPRESARIAL
Bacterióloga. Elsa Beatriz Gelvez Arocha**

**TUTOR ACADÉMICO
Liliana Rojas Contreras**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
Pamplona, 2020**

Nota de aceptación

Firma Jurado

Firma Jurado

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. MARCO REFERENCIAL.....	15
4.1. Marco Teórico	15
4.1.1. Conservación bacteriana	18
4.1.2. Métodos de conservación	19
4.1.2.1. Métodos de conservación a corto plazo	19
4.1.2.2. Métodos de conservación a mediano plazo.....	21
4.1.2.3. Métodos de conservación a largo plazo	21
4.1.3. Crioprotectores.....	22
4.1.4. Caracterización de las cepas	23
4.1.4.1. Clasificación de los métodos de identificación microbiana.	23
4.1.4.1.1. Criterios morfológicos	24
4.1.4.1.2. Control de calidad de cultivos	26
4.1.4.1.3. Estabilidad bioquímica.....	26
4.1.4.1.4. Características de los microorganismos en estudio.....	27
4.2. Antecedentes	28
4.3. Marco legal	33
5. METODOLOGÍA.....	36
5.1. Recepción de las cepas de referencia.....	36
5.2. Codificación de las cepas	36
5.3. Reconstitución de las Cepas de Referencia	37
5.4. Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza	38
5.4.1. Promoción del crecimiento	38
5.4.2. Pureza.....	38
5.4.2.1. Estabilidad morfológica mediante tinción de Gram y características morfológicas en medio sólido.	39
5.5. Conservación de cepas.....	39
5.5.1. Conservación de cepas semi stock o de referencia (En nitrógeno líquido -195°C).....	39

5.5.2.	Conservación de cepas de reserva R2 (En congelación a -20°C) . .	39
5.5.3.	Conservación de cepas de trabajo por métodos alternos R3 (En refrigeración 2-8 °C).....	41
5.6.	Evaluación de los métodos de conservación	41
5.7.	Pureza.....	41
5.8.	Viabilidad de los métodos de conservación en bacterias Grampositivas y Gramnegativas.....	42
5.9.	Actividades que determinan la calidad microbiológica de la carne de pollo	42
5.9.1.	Parámetros microbiológicos.....	43
5.9.1.1.	Enjuagues.	43
5.9.1.2.	Productos crudos.	43
5.9.1.3.	Productos procesados cocidos.....	43
5.9.2.	Metodología para la preparación de las muestras	43
5.9.2.1.	Preparación de la muestra	43
5.9.2.2.	Preparación de las muestras de alimentos para la determinación de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
5.9.3.	Metodología para la determinación microbiana.	44
5.9.3.1.	<i>Salmonella</i> spp.	44
5.9.3.2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	44
5.9.3.3.	<i>Campylobacter</i> spp.....	45
5.9.3.4.	Aerobios Mesófilos, Coliformes y <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacterias ácido lácticas</i> .45	
5.9.3.5.	Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor.....	45
5.9.3.6.	<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.	45
5.9.4.	Superficies	46
5.9.4.1.	Determinación de aerobios mesófilos, coliformes totales y <i>E. coli</i> , hongos.46	
5.9.5.	Aguas.....	46
5.9.6.	Hielos.....	46
5.9.7.	Identificación de microorganismos mediante del sistema de pruebas rápidas API 20E	47
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1.	Instructivo de Preparación, manipulación y almacenamiento de cepas de referencia.	48
6.2.	Recepción de las cepas de referencia.....	48
6.3.	Codificación de las cepas	49

6.4	Reconstitución de las cepas de referencia	51
6.4.1	Método de siembra directa.....	51
6.4.2	Método de siembra (en caldo) Indirecto.....	51
6.5	Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza ..	52
6.5.1	Características morfológicas en medio sólido	52
6.5.2	Pureza.....	55
6.6	Conservación de cepas.	55
6.6.1	Conservación de cepas semi stock o de referencia (en nitrógeno líquido -195°C).....	55
6.6.2	Conservación de cepas de Reserva R2 (en congelación a -20°C)..	56
6.6.3	Conservación de cepas de trabajo (R3) (en refrigeración 2 - 8 °C)	56
6.7.	Actividades que determinan la calidad microbiológica de la carne de pollo y derivados cárnicos.....	57
6.7.1.	Porcentaje de número de análisis realizados por mes.....	57
6.7.2.	Porcentaje de número de muestras de enjuagues de la canal del ave de corral positivas.	58
6.7.3.	Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados crudos.....	59
6.7.4.	Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados cocidos.	60
7	CONCLUSIONES	62
8	RECOMENDACIONES.....	64
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10	ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio (Pacheco <i>et al.</i> , 2013).	27
Tabla 2. Inventario de Cepas de referencia, de reserva y de trabajo.	48
Tabla 3. Codificación de las Cepas de referencia.	49
Tabla 4. Codificación de las Cepas Stock (R1).	49
Tabla 5. Codificación de las Cepas de reserva en congelador -20 (R2).	50
Tabla 6. Codificación de las Cepas de trabajo refrigerador de 2 - 8°C (R3).	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología Macroscópica.....	24
Figura 2. Tinción Diferencial de Gram.....	25
Figura 3. Sistema de pruebas Bioquímicas API	25
Figura 4. Instructivo de preparación, Manipulación y Almacenamiento de cepas de referencia.	48

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de número de análisis realizados por mes.....	57
Gráfica 2. Porcentaje de número de muestras de enjuagues de la canal del ave de corral positivas.	58
Gráfica 3. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados crudos.	60
Gráfica 4. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados cocidos.....	61

LISTA DE FLUJOGRAMAS

Flujograma 1. Método de siembra directa.....	51
Flujograma 2. Método de siembra (en caldo) Indirecto.....	51
Flujograma 3. Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza..	52
Flujograma 4. Conservación de cepas semi stock o de referencia (en nitrógeno líquido -195°C).	55
Flujograma 5. Conservación de cepas de Reserva R2 (en congelación a -20°C).	56
Flujograma 6. Conservación de cepas de trabajo R3 (en Refrigeración a 2 -8°C). ...	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formato Verificación de esterilidad, promoción de crecimiento y selectividad de los medios de cultivo mediante el uso de cepas ATCC.....	72
Anexo 2. Montaje de aguas por Número más probable.(NMP).....	73
Anexo 3. Montaje Microbiología de alimentos.	73
Anexo 4. Montaje de muestras de limpieza y desinfección.	73
Anexo 5. Montaje aguas mediante filtración por membrana.....	73
Anexo 6. Lectura Microbiología alimentos.....	74

1. INTRODUCCIÓN

El uso de cepas de referencia en las diversas áreas de la Microbiología ha ido incrementando de manera progresiva con el objetivo de acreditar un ensayo y verificar la idoneidad de los medios de cultivo y reactivos.

Una cepa de referencia se define como un microorganismo con características fenotípicas y genotípicas conocidas determinadas por el género y especie, en donde se encuentran establecidas sus características y su origen (ISO, 2000). Por consiguiente, dicha recolección microbiana debe ser obtenida directamente de una colección reconocida que cumplan con características típicas, de estabilidad y reproducibilidad.

Así, de manera consecuente, este tipo de cepa garantiza la identidad del microorganismo, la cual posee una documentación validada, por ende, el laboratorio evitará realizar pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos; además, son requeridas para demostrar trazabilidad en diferentes actividades como: 1) evaluación de la calidad de los medios de cultivo, 2) realización de controles de calidad interno durante la ejecución de los ensayos, 3) realización de controles de calidad de reactivos, 4) pruebas confirmatorias y 5) validación de métodos.

Igualmente, el mantenimiento de las cepas mediante la transferencia periódica es un método inadecuado debido a que el microorganismo permanece activo por cortos periodos de tiempo, por esto se considera un método a corto plazo, dado que consiste en sembrar el microorganismo en un medio adecuado y una vez crecido permanece a temperatura ambiente o temperatura de 4°C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El problema de este procedimiento es que se pueden generar mutaciones por cada transferencia con pérdida de las características de los microorganismos (García *et al*, 2000), riesgo de contaminación y adaptaciones al medio de cultivo, lo que termina generando cepas “domesticadas” cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada (Cooper, 2002).

Por esta razón, es importante el manejo y preservación de las cepas de referencia mediante un buen método de conservación con el fin de mantener los microorganismos vivos, puros y la cepa microbiana auténtica; de esta manera, el objetivo de este trabajo es proponer un sistema de mantenimiento y conservación de cepas de referencia utilizadas en el laboratorio de Microbiología de una empresa del sector avícola en Santander.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar una propuesta para la implementación de un sistema de manejo y conservación de cepas utilizadas en el laboratorio de Microbiología de una empresa del sector avícola en Santander.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar orientaciones, procedimientos y vigilancia para la adecuada conservación y manejo de las cepas de referencia.
- Establecer consideraciones generales para el manejo y conservación de cada una de las cepas de referencia utilizadas en la valoración de desempeño de medios de cultivo, control de calidad de reactivos, pruebas confirmatorias y validaciones de métodos.
- Estipular en un instructivo las instrucciones y cuidados para el buen manejo interno de las cepas de referencia.
- Realizar actividades que determinen la calidad microbiológica de la carne de pollo y sus derivados crudos y cocidos, analizados en el laboratorio de Microbiología de una empresa avícola de Santander en el periodo de enero – marzo del 2020 según la normativa vigente.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de cepas de referencia en los laboratorios de Microbiología se ha consolidado debido a que es una herramienta indispensable en el control de calidad interno, puesto que son utilizadas en la inspección de medios de cultivo, en controles de calidad de reactivos, en pruebas confirmatorias, en validaciones de métodos e investigaciones. Este tipo de colección microbiana certifica que se suministra un material biológico de morfología definida a nivel de género y especie, en donde sus características (genotípicas y fenotípicas) garantizan la identidad del microorganismo, por esto, es esencial su adecuada manipulación, preservación y mantenimiento del cultivo con la finalidad de evitar el deterioro de la cepa, contaminación cruzada y mutaciones. Es por ello, que se evidencia la necesidad de crear y mantener cepas de referencia, de manera que las propiedades que las caracterizan y las hace importantes en estas áreas permanezcan estables.

Debido a esto, se plantea analizar una metodología para el manejo y conservación de las cepas microbianas en una empresa del sector avícola de Santander que desde hace tiempo ha venido realizando el mantenimiento de las cepas de referencia mediante el uso de subcultivos seriados, el cual consiste en sembrar el microorganismo cada quince días en un medio adecuado. Debido a que deben ser repicados con frecuencia, se incrementa el riesgo de contaminación; además, al mantenerlos a temperatura ambiente, probablemente sobrecrezcan y de manera espontánea cambien sus características genéticas, afectando al carácter por el que fueron seleccionados; por esta causa se generó la necesidad de buscar y valorar métodos reproducibles y confiables para la preservación microbiana que se ajustaran a las condiciones logísticas y técnicas del laboratorio.

Consecuentemente, trabajar en la organización de un cepario de referencia que garantice la pureza, viabilidad y estabilidad de las cepas por años y a temperaturas que conlleven a resultados confiables es esencial para evitar la pérdida microbiana y los sobrecostos.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Marco Teórico

El uso de los microorganismos ha sido importante en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad (González *et al.*, 2006), en la agricultura, alimentación, salud y en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y la conservación del medio ambiente. Todo esto, ha sido posible gracias a la capacidad de estos para desarrollar variedad de funciones bioquímicas (Olalde *et al.*, 1998); dicha capacidad se basa en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de reacciones: oxidaciones, reducciones y precipitaciones, y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos en la tierra. Dicho esto, los recursos microbiológicos (microorganismos, genes e información) son la materia prima esencial para el avance de la tecnología, las ciencias de la vida (Ivshina *et al.*, 2013), el desarrollo de medicamentos farmacéuticos, agentes agroquímicos, biocontroles, cosméticos y productos industriales. Además, con el surgimiento de los medios de cultivo para el crecimiento y el éxito de los primeros aislamientos de microorganismos, se marcó la necesidad de preservarlos para el futuro y que los gobiernos tuvieran el compromiso de apoyar la conservación de toda la biodiversidad microbiana, logrando la inclusión de este tema en el desarrollo de las políticas ambientales (González *et al.*, 2006). A su vez el papel y las funciones de las colecciones microbianas como infraestructura básica de investigación en ciencias de la vida, llevan una gran cantidad de similitudes con otras colecciones *ex situ* (Stromberg *et al.*, 2013) de animales y plantas; pero se cuentan con características específicas para los microorganismos. En primer lugar, los organismos microbianos tienen una variación genética extremadamente alta y altos índices de mutación en la reproducción en las especies; por lo tanto, se hace necesario mantener los organismos *in vitro* en colecciones *ex situ* (Stromberg *et al.*, 2013) a su lugar de recolección. En segundo lugar, las colecciones proporcionan material para analizar estrategias de conservación, asegurar los recursos genéticos ante futuras necesidades imprevistas e importantes; para proporcionar biomateriales autenticados, para materiales de investigación, exploración y producción, así como su uso contemporáneo por parte de las entidades privadas y públicas (Stromberg *et al.*, 2013). Lo que resulta necesario dado que los microorganismos al igual que otros seres vivos, poseen una única e irremplazable secuencia de ADN, por lo que su desaparición implicaría la pérdida irreversible de un conjunto único de información (Olalde *et al.*, 1998), de ahí la gran importancia en la creación de comités, comisiones, federaciones y grupos de Microbiología como: World Federation for Culture Collection (WFCC), International Union of Microbiological

Societies (UMIS) entre otros, encargados del establecimiento y desarrollo de colecciones de cultivo para la conservación *ex situ* de la diversidad microbiana que sostiene la vida en la tierra (WFCC, 2010b).

Los microorganismos son vitales en el trabajo de laboratorio, dado que se usan en la fabricación de antibióticos; en la industria alimentaria se utilizan en procesos de elaboración de ciertos productos; como indicadores biológicos en la etapa productiva o como tal en el producto terminado; en la elaboración de solventes y reactivos, e investigaciones en general; debido a lo esencial que son; en el laboratorio es importante contar con cepas de referencia dado que proporcionan trazabilidad esencial en las mediciones y son utilizados para demostrar que los medios (incluidos los kits de análisis) poseen características aceptables, para validar métodos y para controlar que se mantienen sus características; para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe usar cepas de referencia de microorganismos obtenidos directamente de una colección nacional o internacional (ISO, 2014).

Es importante asegurar que los microorganismos sean viables para su estudio, luego de haber demostrado su importancia deben ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos para garantizar su disponibilidad; dado que el uso de microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad, es necesario contar con cepas de referencia que aseguren al ser comparadas el género y especie del microorganismo aislado con la finalidad de verificar y validar este tipo de procedimientos.

En el manejo de las cepas bacterianas de referencia deben considerarse los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo de calibración establecidos en la Norma ISO 17025 del 2005 correspondiente a laboratorios de calidad en su apartado 5.6 pertinente a trazabilidad de las mediciones indica lo siguiente:

Todos los equipos utilizados para los ensayos o las calibraciones, incluidos los equipos para mediciones auxiliares (por ejemplo, de las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o en la validez del resultado del ensayo, la calibración o del muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe establecer un programa y un procedimiento para la calibración de sus equipos. Además, la norma indica que es conveniente que dicho programa incluya un sistema para seleccionar, utilizar, calibrar, verificar, controlar y mantener los patrones de medición, los materiales de referencia utilizados como patrones de medición, y los equipos de ensayo y medición utilizados para realizar los ensayos y las calibraciones. Una vez examinadas las regulaciones establecidas por la normativa ISO/IEC 17025 se observa la importancia en sistemas donde son necesarias calibraciones para tener resultados confiables, también constituye un sistema que permite realizar

un seguimiento del estado de los microorganismos de referencia utilizados y la constancia de sus características. Además, el cumplimiento de estas condiciones permite la comparación de resultados entre laboratorios que operen bajo las mismas condiciones (prueba y microorganismo de referencia) (Pacheco *et al.*, 2013); es decir el uso de materiales de referencia aseguran y garantizan una validez en proyectos de investigación, en procedimientos estandarizados, etc.

El uso de material de referencia y la comprobación de sus características debe realizarse con sumo cuidado, evaluando cada uno de los componentes ya sean medios de cultivos, kits, cepas de referencia con el fin de corroborar que el manejo de estos materiales se está realizando adecuadamente y si realmente están cumpliendo con sus características. Dado que la disponibilidad de estos materiales en el laboratorio da confianza asegurando la calidad de los ensayos, y así mismo su fiabilidad.

La aparición de las técnicas de conservación es el comienzo de una serie de evoluciones que se da en el mundo de la Microbiología. Hacia el año 1890, aparecen las primeras colecciones de bacterias y hongos en Praga (República Checa) producidas por el coleccionista Frantisek Kral, pero este instituto cierra y se pierden las colecciones de cultivo, a pesar de ello algunos científicos desarrollan colecciones privadas.

En 1906, se publica el primer catálogo de cepas de hongos de la International Botany Association (Holanda), luego el CBS (Central Bureau voor Schimmel cultures), en 1911 la Colección de Bacterias en el National History Museum of New York City, que es el antecesor de ATCC (American Type Culture Collection) fundado en 1925 y de gran utilidad internacional hasta la fecha por ser la más grande del mundo y una de las más confiables. En 2003, se designan 23 instituciones internacionales autorizadas para recibir material biológico con una patente de aplicación (Tratado de Budapest, 1991), en Argentina es el Instituto Malbrán.

El método de preservar la diversidad de microorganismos en el planeta, fuera de sus ambientes, ecosistemas y nichos, ha sido la creación de colecciones biológicas, cuyo principal objetivo es mantener las cepas en un estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos (Montes de Oca *et al.*, 2008). Las colecciones de cultivos microbianos varían en forma, función y tamaño. Pueden ser pequeñas, privadas, mantenidas por un solo investigador y limitado a una fuente o taxones específicos (Durães *et al.*, 2013).

La conservación de las cepas bacterianas debe garantizar la viabilidad, preservar los niveles de productividad inicial y mantener la pureza, la estabilidad genética del cultivo sin perder sus propiedades bioquímicas; el método de conservación a elegir debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un periodo considerable de tiempo, de forma tal, que la población

sobreviviente se asemeje a la original tanto como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de las alteraciones genéticas. De igual manera, debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y de esa manera el cultivo permanezca puro e inalterable (García *et al.*, 2013).

Es esencial la estabilidad y viabilidad de las cepas, por ello es relevante considerar el número de repiques realizados a cada una de ellas (hasta 5 repiques como máximo), el periodo durante el cual se usará la cepa, la manipulación y el control periódico de las cepas, el espacio de almacenamiento disponible, para ser empleadas como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica.

La preservación bacteriana se basa en la inactivación metabólica del microorganismo (Mazur, 1970) por diferentes metodologías, entre las cuales destacamos la preservación a corto, mediano y largo plazo en donde es indispensable considerar tres recomendaciones generales para su correcta preservación:

- Se deben evitar contaminaciones durante el proceso de conservación.
- Durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan al menos el 70% de las células por un periodo considerable de tiempo en una densidad elevada.
- Permaneciendo genéticamente estables (García, 2000).
- Es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada y mucho del conocimiento que se tiene recaudado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica (García *et al.*, 2013).

4.1.1. Conservación bacteriana

Las bacterias sostienen la vida de nuestro planeta y aunque sólo se conoce alrededor del 1% de su diversidad muchas de ellas pueden resultar benéficas para ser utilizadas con fines biotecnológicos, agrícolas, biomédicos, ecológicos y de biorremediación (Castro *et al.*, 2000). Otras bacterias degradan compuestos tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente, muchas de ellas producen compuestos antimicrobianos que pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades y/o productos importantes para la industria (Vandamm *et al.*, 1996).

Las bacterias se originaron aproximadamente hace 2.5 billones de años y se considera que albergan características genéticas que han evolucionado desde entonces y que podemos utilizarlas para nuestro beneficio. Para estudiar y explotar esas potencialidades, es conveniente resguardar a las bacterias en bancos, conservando sus características y viabilidad.

En la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés) se hallan variadas técnicas disponibles para la conservación de microorganismos, por lo que debe considerarse la guía "Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" publicada en 2010 apartado 7 de sus guías generales (World Federation for Culture Collections, 2020), en la que establece que por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos procedimientos diferentes que brinden seguridad y reduzcan los riesgos de pérdida durante el almacenamiento (Hawksworth *et al.*, 1999).

Dependiendo al tiempo de conservación los métodos de conservación se agrupan en tres grupos a corto, mediano y largo plazo.

4.1.2. Métodos de conservación

Los métodos de conservación permiten mantener hasta un 90% los microorganismos viables durante un determinado periodo de tiempo, de manera que se conserven estables y sin ningún cambio morfológico, fisiológico o genético (Parra *et al.*, 2006). La conservación de cultivos permite preservar el microorganismo sin sufrir cambios genéticos o bioquímicos, conservar su productividad inicial y conseguir que el cultivo sea fácilmente transportado y manejado (Corredor, 2002; García *et al.*, 2013).

Por tal razón, en el momento de seleccionar cierto método de conservación hay varios factores que se deben tener en cuenta, entre los que se encuentran:

- El tipo del microorganismo a conservar: Este debe tener características como velocidad de crecimiento alta, estar libre de microorganismos contaminantes, además el microorganismo debe recuperarse fácilmente en el medio de cultivo adecuado.
- Tiempo de conservación del microorganismo ya que existen métodos desde los 15 días o 2 meses hasta 20 años.

4.1.2.1. Métodos de conservación a corto plazo

Estos procedimientos son frecuentemente usados en laboratorios de primer nivel con ceparios pequeños, donde no se cuenta con la infraestructura adecuada ni el presupuesto para la preservación bacteriana. Ayudan al mantenimiento de las cepas, generalmente para el uso frecuente donde se requiera la cepa activa. Dentro de ellos, se incluyen los subcultivos o el cultivo

seriado, preservación en aceite mineral o agua destilada estéril y otro grupo de métodos de preservación denominados métodos restringidos, basados en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible de la célula (García, 1991).

4.1.2.1.1. Subcultivos

El método comúnmente usado es el cultivo seriado o subcultivo. En éste, el microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se guarda a 4°C, donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El problema de este procedimiento es que se pueden generar mutaciones por cada transferencia con pérdida de las características de los microorganismos (García *et al.*, 2000).

4.1.2.1.2. Conservación por suspensión en agua estéril

Este método alternativo y muy utilizado debido a su bajo presupuesto, fue descrito originalmente por Castellani en 1939 (Jong *et al.*, 1985). Ofrece altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias poco exigentes (Devay, 1963). Según (Crist *et al.*, 1984) en este método la cepa es cultivada en un medio líquido y después de concentrada por centrifugación es resuspendida en un volumen igual de agua destilada estéril, conservándose a temperatura ambiente en oscuridad y/o en refrigeración, con una concentración celular no superior a $10^4 - 10^5$ células/ml para bacterias y levaduras (Lacobellis, 1986).

4.1.2.1.3. Conservación en suelo estéril

Este método consiste en esterilizar y secar el suelo el cual es utilizado como medio absorbente para una pequeña cantidad de inóculo. Debido a que sus nutrientes y humedad son reducidos considerablemente, limitando no solo el metabolismo bacteriano si no también su periodo de vida, este siempre se ha tomado como última opción en la conservación de microorganismos.

En general, los métodos de preservación a corto plazo poseen alto riesgo de contaminación celular debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales normales. Según (Potts, 1994) en el caso específico de la desecación, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua

razón por la que el número de células viables disminuye notablemente, especialmente para microorganismos sensibles.

4.1.2.2. Métodos de conservación a mediano plazo

4.1.2.2.1. Congelación bacteriana

Es un método fisicoquímico que permite conservar microorganismos viables a temperaturas entre -20°C y -80°C por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos (Allievi, 1993). En este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado líquido a sólido. Las bacterias inmersas en este medio deben adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar los daños ocasionados por la aparición de cristales de hielo formados por el cambio de temperatura (James, 1984). Para su desarrollo, primero se cultiva al microorganismo en cuestión y se deja crecer hasta la fase estacionaria temprana, las células del cultivo se lavan o no, con una solución tampón y después son adicionadas con un volumen equivalente de una suspensión que contiene una sustancia que deberá funcionar como protectora de las células a la congelación (Perry, 1995). Esta sustancia conocida con el nombre de crioprotector, evita la formación de cristales de hielo y el estrés osmótico generado por la baja disponibilidad de agua, durante el proceso de congelación (Perry, 1995).

4.1.2.3. Métodos de conservación a largo plazo

4.1.2.3.1. Crio congelación

La sobrevivencia de los microorganismos conservados por congelamiento puede ser aumentada usando temperaturas ultra bajas, las que pueden ser conseguidas con el uso de nitrógeno en la fase de vapor (-196°C) o en la fase líquida (-150 a -180°C). Estas temperaturas permiten el almacenamiento por periodos prolongados y la mayoría de las bacterias pueden ser recuperadas con un 90-100% de sobrevivencia (Zuberer, 1987), esto, debido a que el cultivo puede sufrir pérdidas de viabilidad durante las etapas de congelación y descongelación, pero no durante el periodo de almacenamiento. (Stanbury *et al.*, 1995) propuso la congelación con nitrógeno líquido como la técnica idónea o alternativa para conservar por largos periodos de tiempo aquellas células que no sobreviven al proceso de liofilización.

4.1.2.3.2. Liofilización

La liofilización o criodesecación, es uno de los métodos más utilizados para la conservación de cepas bacterianas (Zuberer, 1987). Fue introducido en 1903 cuando Vansteenberghe liofilizó el virus de la rabia sobre ácido sulfúrico bajo vacío. Su principio básico, consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas que pasan directamente a un estado de vapor debido a que no hay presión molecular que lo impida (Date, 1987). En este método, las muestras que contienen la suspensión de microorganismos son previamente congeladas (usando nitrógeno líquido) e inmediatamente expuestas al vacío. El vapor de agua extraído es atrapado por un condensador de refrigeración que opera a -110°C . El vacío debe ser casi absoluto (menos de 10mTorr; $10\mu\text{m}$ de Hg), lo que provoca la evaporación del hielo con la consiguiente pérdida de calor que se produce en el proceso (Palmfeldt *et al.*, 2003). Después de la “desecación”, las células bacterianas se mantienen en viales individuales o en ampollas y bajo condiciones de vacío o se les aplica un gas inerte. Una vez que se liofilizan, los microorganismos pueden permanecer en un lugar fresco a una temperatura que oscile entre los 15°C a los 25°C , esto significa guardar a las muestras liofilizadas a temperatura ambiente, lo que reduce en gran medida los costos energéticos que se requieren para mantener las bajas temperaturas de un ultracongelador (Manzanera *et al.*, 2002).

4.1.3. Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias que se han reportado como solutos compatibles e hidrosolubles de baja toxicidad, cuyas funciones principales consisten en la disminución del punto de fusión de una solución dada (Hubálek, 2003), reducción de la concentración intra y extracelular de electrolitos y evitar la excesiva deshidratación celular a temperaturas bajo cero (Ciba, 1977); todo ello, basado en: 1) la estabilización de proteínas celulares (Fahyet *et al.*, 1987); 2) mantenimiento en equilibrio del potencial químico del agua intra y extracelular (Ciba, 1977); 3) sustitución de las moléculas de agua removidas durante la congelación (Meryman, 1966) y finalmente, 4) bloqueo de toxicidad por parte de otros crioprotectores (Fahyet *et al.*, 1987).

No obstante, a pesar de sus varias funciones y aun así aplicando óptimas tasas de enfriamiento y descongelación, la sobrevivencia de los microorganismos a la congelación no llega fácilmente al 100% (Fahy, 1986). Esto, debido posiblemente a la toxicidad que ejerce sobre las células. En este contexto, los

crioprotectores pueden producir dos tipos de toxicidad: una directa o bioquímica y otra osmótica. Según Fahy y colaboradores (1987), la toxicidad directa está relacionada con interacciones entre crioprotector, proteínas y membranas, en donde el crioprotector tiene la capacidad de producir desnaturalización proteica y/o enzimática, interferencia con las bombas iónicas y solubilización de lípidos de membrana, generándose así muerte celular.

Los crioprotectores protegen la célula durante el enfriamiento al estabilizar proteínas. No obstante, a temperaturas fisiológicas producen desnaturalización proteica. Estas sustancias poseen características hidrofóbicas e hidrofílicas, las cuales son favorecidas a altas y bajas temperaturas, respectivamente. Debido a ello, cuando la célula es expuesta a procesos de descongelación utilizando altas temperaturas, las uniones hidrofóbicas predominan y el crioprotector se une a la proteína causando desnaturalización. A este, proceso, se le denomina toxicidad osmótica (Arakawa *et al.*, 1990).

4.1.4. Caracterización de las cepas

El personal de laboratorio debe conocer las normas de calidad microbiológica del producto a ser elaborado, los microorganismos objetables y el fundamento de los métodos estandarizados para descartar la presencia de estos. También en el caso de la industria alimentaria, los alimentos son sometidos a una serie de controles microbiológicos para asegurar la ausencia de microorganismos que pueden causar enfermedades y/o descartar la presencia de toxinas capaces de causar intoxicaciones alimentarias; por lo cual es importante conocer métodos en los cuales la identificación microbiana. No todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas, la mayor parte de los métodos se realizan en un laboratorio y se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles.

En la mayoría de los casos la identificación no se realiza con base a un solo método, sino a la combinación de más de uno para lograr una identificación más exacta.

4.1.4.1. Clasificación de los métodos de identificación microbiana.

Los métodos utilizados en la actualidad para la identificación microbiana, dependiendo de su fundamento, se pueden clasificar en:

- Criterios morfológicos

- Tinción diferencial
- Pruebas bioquímicas
- Tipificación con fagos
- Pruebas serológicas
- Detección molecular

4.1.4.1.1. Criterios morfológicos

Son características estructurales de los microorganismos, es decir, a nivel macroscópico se pueden distinguir características: forma de la colonia y su aspecto; mientras que a nivel microscópico se pueden distinguir la presencia de diferentes tipos de organelos (Cilios o flagelos y sus posiciones respectivas) o la presencia de esporas entre otras características.

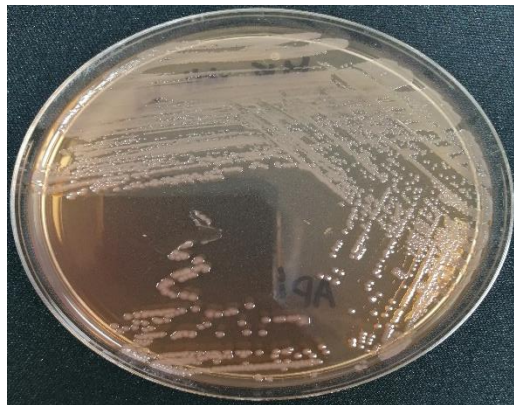


Figura 1. Morfología Macroscópica

Fuente: Autor

4.1.4.1.2. Tinción Diferencial

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. La mayor parte de las bacterias, teñidas con Gram, las podemos clasificar como Grampositivas o Gramnegativas, debido a características presentes en la composición de su pared celular, en el caso de las Gram negativas esta pared se compone por una fina pared celular de peptidoglicano que no retiene el colorante durante la tinción de Gram, mientras que las Gram-positivas presentan una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa.

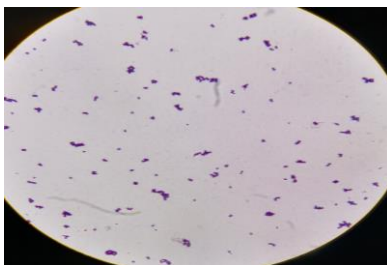


Figura 2. Tinción Diferencial de Gram

Fuente: Autor

4.1.4.1.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Aun bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes con base a pruebas bioquímicas. El tiempo necesario para la identificación de bacterias puede reducirse considerablemente con el uso de sistemas miniaturizados basados en pruebas bioquímicas. Estas herramientas que permiten reducir el tiempo del reporte, en primer lugar, fueron elaborados para bacterias de importancia médica, tales como las Enterobacterias. Estos sistemas han sido diseñados para realizar varias pruebas bioquímicas simultáneamente y permitir la identificación en un tiempo más corto. Cada uno de los ensayos, consta de tubos miniaturizados que contienen el medio de cultivo que se hidratan al inocularse con la suspensión bacteriana pura. Las pruebas se clasifican en grupos; a cada uno de los resultados positivos de los ensayos se le asigna un determinado valor numérico, obteniéndose un código que corresponderá a un determinado género o especie en un texto de la base de datos.



Figura 3. Sistema de pruebas Bioquímicas API

Fuente: Autor

4.1.4.1.2. Control de calidad de cultivos

Las colecciones de cultivos deben desarrollar programas de investigación para determinar y asegurar la estabilidad de las cepas. Las propiedades conocidas deben chequearse periódicamente, pero para estimar la estabilidad con precisión debe seleccionarse una propiedad que no sea estable en la cepa y chequear su comportamiento en el tiempo (siempre que sea posible) (*Jennie et al.*, 1996). Los estudios de estabilidad pueden incluir el chequeo en el tiempo de la viabilidad, la pureza y la identidad de las cepas. La viabilidad se refiere al mantenimiento de la funcionalidad de la célula para llevar a cabo los procesos de su ciclo de vida: crecimiento, multiplicación.

4.1.4.1.3. Estabilidad bioquímica

Se refiere al mantenimiento de las características bioquímicas de un microorganismo a lo largo del tiempo, es decir, aquellas que denotan características específicas del metabolismo y productos desarrollados a partir de éste, es en pocas palabras, que las características identificadas inicialmente del microorganismo en estudio se mantengan a lo largo del estudio determinando que el microorganismo mantiene su identidad y su utilidad, garantizando obtener los resultados esperados, lo que hace de esta característica una de las más importantes para evaluar la efectividad de un método de conservación de microorganismos además de garantizar la viabilidad de los mismos.

4.1.4.1.4. Características de los microorganismos en estudio.

A continuación, en la Tabla 1 se describen brevemente las propiedades que identifican a cada uno de los microorganismos a estudiar con respecto a su morfología macroscópica, características bioquímicas, morfología microscópica y aplicaciones.

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio (Pacheco *et al.*, 2013).

Rasgo Bacteria	Morfología Macroscópica	Características Bioquímicas	Tinción de Gram	Aplicaciones
<i>Salmonella spp.</i>	Colonias circulares, convexas de borde redondo y aspecto cremoso, Colonias grandes de 2 a 4 mm, rugosas o lisas. En agar Bismuto-sulfito, presenta colonias de negro a verdoso.	Indol (-), Ureasa (-), lipasa (-), Lisina (+), Ornitina (+), Citrato de Simmons (+), H ₂ S (+) y Movilidad (+). Resiste la congelación en agua y la desecación	Bacilos de 0,7 – 1,5 x 2 – 5 µm, Gram negativos, generalmente móviles peritricos.	<ul style="list-style-type: none"> Control de calidad de medios de cultivo. Control de prueba preparatoria de límites microbianos.
<i>Escherichia coli</i>	Las colonias en agar nutritivo son lisas, convexas, húmedas de superficie brillante con bordes lisos.	Oxidasa, (-), Voges Proskauer (-), H ₂ S (-), Ureasa (-), Lipasa (-), Catalasa (+), rojo de metilo (+)	Son bacilos rectos Gram negativos de 1.1 -1.5µm de ancho por 2 – 6µm de largo. Se presentan aislados o en pares y pueden o no poseer cápsula	<ul style="list-style-type: none"> Pruebas de resistencia de coliformes en agua. Control de calidad de medios Prueba de Limite microbiano.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Colonias mucoides, rugosas. La mayoría presenta una coloración verde por la difusión de pigmentos. Crece con un color verde característico en agar Cetrimide.	Puede producir pioverdina (pigmento verde), piorrubina (pigmento rojo) piocianina, Catalasa (+), Oxidasa (+).	Bacilos rectos o ligeramente curvados, de 0.5- 1.0 x 1.5-5.0µm, Gram negativos, con flagelos unipolares, no visibles a la tinción.	<ul style="list-style-type: none"> Pruebas de Sensibilidad. Control de calidad de medio. Prueba de Limite microbiano.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sobre medios sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes de color gris a dorado. En agar Baird-Parker se muestra como colonias negras puntiformes con un halo transparente alrededor. Pueden producir grado	Coagulasa (+) fibrinolisisina (+) hialuronidasa (+) termonucleasas (+) bacteriocinas (+) penicilinasas (+) ADNasa (+)	Cocos Grampositivos que forman racimos en forma de uva.	<ul style="list-style-type: none"> Prueba de eficacia de perseverantes Control de calidad de medios de cultivo. Prueba de Limites microbianos

	variable de hemolisis.			
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colonia β hemolítica. Hidroliza la esculina a esculetina y la glucosa en presencia de sales biliares.	Catalasa (+) Oxidasa (+) Ureasa (-) Indol (-) Voges proskauer (+) Rojo Metilo (+)	Bacilos Grampositivos bacilos pequeños, rectos (unos pocos pueden ser curvados) con extremos redondeados. Se presentan aislados, en grupos en V o en L, en empalizada, y algunas veces en cortas cadenas; con un tamaño de 0,5 - 2 x 0,5 micras.	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de eficacia de pereservantes • Control de calidad de medios de cultivo. • Prueba de Limites microbianos

4.2. Antecedentes

Arencibia *et al.*, (2008) analizaron la importancia de contar con colecciones bien conservadas que cumplan con un buen proceso de conservación. Donde el cultivo a conservar sea puro, evitando contaminaciones; donde el porcentaje de recuperación de las células sea al menos el 70 - 80% y que el cultivo permanezca genéticamente estable. Además, discuten sobre lo esencial que es que los cultivos de microorganismos conserven determinadas características para la mayoría de los ensayos microbiológicos, como los cultivos de referencia o controles que son utilizados en un amplio número de determinaciones, debido a que no pueden obtenerse resultados válidos si no se trabaja con cultivos de alta calidad; por ello una colección de cultivos bien conservada es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio. Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables. 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. Para lograr estas condiciones se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original.

Cody *et al.*, (2008) analizaron el porcentaje de recuperación de cepas congeladas en leche descremada al 10% a -80°C en paralelo con cepas congeladas en glicerol al 15%, en donde se recuperó más del 90% de las cepas congeladas en leche descremada, mientras que las tasas de recuperación para

las cepas almacenadas con glicerol el porcentaje de recuperación fue de 56% y 94% dependiendo del laboratorio. Concluyendo que en todas las bacterias examinadas (*Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *Salmonella entérica sub sp. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*), el procedimiento con leche descremada resultó con una viabilidad significativamente de mayor tiempo después de la descongelación que con las soluciones de glicerol al 15% usada en los laboratorios.

Montes de Oca *et al.*, (2008) establecieron como objetivo primario de su investigación para la concepción de una colección de cultivos microbianos, mantener las cepas en un estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos. Puesto que con el desarrollo de la Biotecnología y la Bioingeniería el mantenimiento de esta estabilidad y viabilidad adquiere mayor importancia. Para el establecimiento y operación de la colección del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) utilizaron los requisitos de la World Federation Collection Culture (WFCC, 1999), de la ISO 9001:2000 y de las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación y Laboratorios, así como las disposiciones estatales para el manejo del material biológico. Su establecimiento permitió el desarrollo de aspectos como son: Documentación, identificación, autenticidad, pureza, viabilidad y estabilidad de las cepas, mantenimiento de los equipos, procedimientos para el suministro e intercambio de cepas, seguridad a largo plazo, control de las condiciones ambientales, auditorías, cumplimiento de las legislaciones, personal, entrenamiento y bioseguridad. Brindando recomendaciones prácticas para los responsables o curadores de colecciones de microorganismos y para el establecimiento de un sistema de calidad que asegure el manejo del material biológico que participa en los procesos de investigación, producción y servicios que brindan las instituciones científicas o productoras del país.

Soto, (2010) basa su estudio en la microbiota autóctona de los terneros lactantes de donde se pueden obtener un importante número y variedad de BAL, algunas de las cuales poseen propiedades probióticas que contribuirán a disminuir la incidencia de las infecciones intestinales de los terneros criados artificialmente y aumentarán su performance. Teniendo como objetivo determinar las mejores condiciones de conservación de un inóculo, conformado por bacterias ácido lácticas indígenas con capacidades probióticas, para que al ser administrado en el campo a terneros lactantes criados en condiciones artificiales les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea. Donde el diseño de una metodología de conservación adecuada permitirá la utilización de estas bacterias en condiciones de campo para mejorar la rentabilidad de los sistemas de crianza de terneros en condiciones artificiales. Evaluaron tres técnicas de conservación de las bacterias seleccionadas como probióticas: refrigeración, congelación y encapsulación. Obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad por congelación que por refrigeración donde el método

por refrigeración mantenía viable por 84 días las cepas comparándose que por congelación las cepas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo que llevó el estudio por 365 días.

Morales *et al.*, (2010), discutieron varias metodologías para preservar a las bacterias de forma correcta, tomando en consideración que se deben mantener sus características fenotípicas, genotípicas, y una alta viabilidad. Características que asegurarán el mantenimiento del gran potencial biotecnológico que las bacterias resguardarán en sus genomas. Los autores infieren en que las formas de preservación variarán dependiendo de las condiciones de laboratorio (infraestructura) y del microorganismo en cuestión. Describen que entre cuanto más conozcamos con relación a la supervivencia de las distintas cepas bacterianas a condiciones de congelación, desecación y liofilización, mejor entenderemos las alternativas adecuadas para preservar al microorganismo en cuestión, lo que será fundamental para el establecimiento de un banco de cepas con alto valor biotecnológico. Establecieron que la preservación bacteriana es fundamental no solo para el resguardo de una cepa con potencial biotecnológico, también es importante para el estudio futuro en la búsqueda de nuevas funciones de los genes de una bacteria de interés. En esta revisión abordaron el ejemplo de un banco de cepas mutantes de *Pseudomonas putida* KT2440, resguardado por congelación y liofilización; el cual contiene más de 3.000 cepas mutagenizadas en diversos genes y cuyas mutantes se están estudiando a profundidad para la elucidación de la función de los genes mutagenizados. A pesar de que la preservación de *P. putida* mediante liofilización ha sido exitosa (Muñoz *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007), deben considerarse el estudio específico, para encontrar las condiciones adecuadas para el resguardo de otras especies bacterianas benéficas. El artículo de revisión pone de manifiesto el todavía largo camino por recorrer hacia el conocimiento del resguardo de bacterias y sus potenciales beneficios.

Kumar *et al.*, (2013), explican en su capítulo de preservación y mantenimiento de cultivos microbianos que la preservación y el mantenimiento requieren una atención especial y cuidadosa para asegurar que el cultivo recuperado funcione de la misma manera que los cultivos originales. De igual manera, describen algunos procedimientos y protocolos importantes involucrados en la conservación y preservación de cultivos microbianos.

Alfonso *et al.*, (2015) estudiaron un grupo de réplicas de cepas bacterianas tipos que son conservadas en el laboratorio de bacteriología del Centro de investigaciones científicas defensa civil (*Enterobacterias*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la viabilidad (supervivencia) y las características originales: culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de un grupo de microorganismos después de 5 años de conservación en una mezcla estéril de leche descremada y glicerol, a una concentración final de 10 y 20 % respectivamente, contenidas en ampulas de

crioconservación y a una temperatura de -25°C . Todas las cepas que fueron estudiadas y sus réplicas, crecieron en los medios de siembra utilizados a la temperatura, atmósfera y tiempo de incubación requeridos, por lo que determinaron un 100 % de viabilidad. Comprobaron que los microorganismos mantenían sus características morfológicas, microscópicas y tintoriales, y las mismas características de los cultivos en los medios sólidos y sus propiedades bioquímicas del momento de la conservación. Los resultados que los autores obtuvieron con el uso de esta forma de conservación proporcionaron garantía y seguridad para la utilización de las cepas en correspondencia con sus funciones en la colección de materiales biológicos; promoviendo la continuidad de estudios similares, como una manera de comprobar los objetivos principales de la conservación de cultivos microbianos.

Castañeda, (2015) evaluó el estado de criopreservación de cinco cepas bacterianas mediante pruebas de viabilidad, implementando y estandarizando además el sistema de liofilización, teniendo como punto de partida a los mismos, evaluándolos frente a tres compuestos protectores; utilizando técnicas de recuento en placa estándar. Además, se realizaron los ajustes pertinentes a los protocolos de seguridad de la criopreservación y, se diseñaron los protocolos para la implementación del sistema de liofilización con las cinco cepas y el lioprotector que presentó mejores resultados en este estudio. De acuerdo con la evaluación del método de conservación, la sacarosa fue el mejor lioprotector de los tres evaluados, siendo la concentración al 10%p/v la óptima. No obstante, su alto grado de higroscopicidad resulta el mayor inconveniente para el almacenamiento a largo plazo, por ello es indispensable que cada vial usado sea sellado herméticamente y al vacío. El segundo mejor protector corresponde a la leche descremada, aunque no se determinó la concentración óptima. En cuanto a la glucosa, al comparar los resultados de Hensel (1994), lograron observar que, pese a no ser un buen lioprotector, concentraciones de glucosa entre el 6% y el 10% p/v son funcionales, aunque por lo general, el porcentaje de supervivencia es menor al 50%. De esta manera, el autor obtuvo la creación de un manual de laboratorio para la conservación de cepas, que incluye los protocolos de criopreservación y liofilización y de seguridad de los mismos. Aportando al campo de la Microbiología de la conservación y constituye un peldaño más para el registro del Banco Genético del Laboratorio de Microbiología de la Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (CM-UDFJC), ante las instituciones nacionales e internacionales correspondientes.

Grauer *et al.*, (2015) en su proyecto evaluaron distintos medios lipoprotectores para la liofilización de tres cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis*; considerando como objetivo general poner a punto un protocolo de liofilización que permita conservar diversas cepas bacterianas con el fin de conservar los bancos maestros y de trabajo del cepario

de producción de la empresa Laboratorios Microsules. El estudio consistió en la formulación y liofilización de tres cepas bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis*, utilizando un liofilizador a nivel de laboratorio. Leche descremada, sacarosa, leche descremada en combinación con glicerol y leche descremada en combinación con sacarosa fueron los lipoprotectores probados. Los parámetros que fueron evaluados consistieron en la estructura física del producto final, el efecto del paso de congelado en la liofilización, la viabilidad celular luego del proceso de liofilización y la viabilidad, luego de la prueba de estabilidad acelerada (5 días a 37°C). Observaron que el uso de mezclas de lipoprotectores permite alcanzar mayores porcentajes de recuperación celular en las cepas estudiadas. Proveyendo a la empresa interesada con un protocolo de liofilización para la conservación de microorganismos a largo plazo.

Berneio *et al.*, (2016) conservaron doce cepas microbianas provenientes de trabajos de investigación realizados por instructores y aprendices empleando las técnicas de preservación en agua destilada estéril y glicerol al 10 %. Dicha conservación se realizó en tubos crioviales de 2 ml ajustados a una densidad óptica 1 (9×10^8 UFC/ ml) de la escala de McFarland. La viabilidad y pureza de las cepas conservadas se evaluó, reactivándolas en medios de cultivo selectivos para cada tipo de microorganismo, con el fin de observar cambios en las características fisiológicas y morfológicas de los cultivos y determinar la eficiencia de los métodos de conservación evaluados. De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se pudieron identificar plenamente 12 géneros microbianos correspondientes a: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomona putida*, *Pseudomona mendocina* y *Hafnia alvei*, así mismo se observó un crecimiento positivo de estos microorganismos conservando su viabilidad y pureza en las dos técnicas de preservación utilizadas.

Naranjo *et al.*, (2018) evaluaron los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por el método de congelación durante un periodo de dos meses y así, estandarizar un método para la conservación de cepas microbianas para el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Química. Utilizaron para el crecimiento de las cepas medio de cultivo caso, caldo BHI y como sustancias crioprotectoras aceite mineral y glicerol. Observándose que las cepas estudiadas conservaron sus características propias con un elevado grado de pureza durante el tiempo evaluado. Tanto el aceite mineral como el glicerol resultaron ser buenas sustancias crioprotectoras. Concluyeron que la conservación por congelación es un método de gran utilidad que garantiza la viabilidad y disponibilidad de las cepas para diversos estudios.

Sharma *et al.*, (2018) abordaron la preservación a corto, mediano y largo plazo de microorganismos de importancia agrícola, así como las colecciones de cultivos y sus funciones, plantearon temas en donde el enfoque explica la importancia de los métodos convencionales para la conservación de bacterias, hongos y algas, así como métodos y estrategias para preservar microorganismos recalcitrantes. El objetivo del trabajo es promover el conocimiento de la riqueza microbiana de nuestro mundo y presentar estrategias y metodologías para la conservación de microorganismos, que en última instancia podrían salvar la vida humana en la tierra.

Facco *et al.*, (2019) evaluaron la supervivencia y el mantenimiento de la viabilidad celular de la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus fermentum* y la levadura *Wickerharmomyces anomaluss*, ambas aisladas de la masa madre del trigo, realizaron la liofilización con diferentes crioprotectores y almacenamiento a temperatura ambiente durante un año. Los tratamientos incluyeron la adición de una solución control (0.1% de agua con peptona) y cuatro soluciones crioprotectoras (sacarosa al 10%, Trehalosa al 5%, leche descremada en polvo al 10%, leche descremada al 10% más polvo de glutamato al 5%). Para verificar el efecto de la liofilización en el número de células microbianas recuperadas, se realizaron análisis microbiológicos y se calculó la viabilidad celular antes y después de la liofilización y regularmente durante un periodo de almacenamiento de 365 días a temperatura ambiente. Observaron diferentes respuestas del microorganismo a algunos protectores entre las bacterias ácido lácticas y la levadura evaluada. Denotando mayor porcentaje de recuperación en los procedimientos donde la matriz usada fue la leche descremada en polvo más glutamato sódico del 100% para *L. fermentum* observando un porcentaje del 87% de viabilidad después del año, seguido de la leche descremada en polvo al 10% donde se obtuvo resultados del 96 y 74% de viabilidad, respectivamente.

4.3. Marco legal

- Decreto Ministerio de Salud N° 60 de 2002: por el cual se promueve la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico - HACCP en las fábricas de alimentos y se reglamenta el proceso de certificación (Minsalud, 2002).
- Decreto Ministerio de Salud y protección social N° 1500 de 2007: Por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos, destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se

deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación (MSPS, 2007).

- Decreto Ministerio de Salud y protección social N° 2270 de 2012: Por el cual se modifica el Decreto Ministerio de Salud y protección social N° 1500 de 2007, modificado por los Decretos Ministerio de Salud y protección social N° 2965 de 2008, 2380, 4131,4974 de 2009, 3961 de 2011, 917 de 2012 y se dictan otras disposiciones (MSPS, 2012).
- Resolución Ministerio de Salud y protección social N° 4287 de 2007: Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de las aves de corral destinadas para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desprese, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación (MPS, 2007).
- Resolución Ministerio de Salud y protección social N° 0242 de 2013: Por la cual se establecen los requisitos sanitarios para el funcionamiento de las plantas de beneficio de aves de corral, desprese, almacenamiento, comercialización, expendio, transporte, importación o exportación de carne y productos cárnicos comestibles (MSPS, 2013).
- Resolución Ministerio de Salud y protección social N° 241 de 2013: Por la cual se establecen los requisitos sanitarios que deben cumplir las plantas especiales de beneficio de aves de corral (MSPS, 2013).
- NTC 3644-2 de 2018: Industrias alimentarias. Pollo en canal y sus cortes. Requisitos (NTC, 2018).
- AOAC 990.12: Recuento de colonias aeróbicas en los alimentos (método Petrifilm™).
- NTC 4458 de 2018: Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos (NTC, 2018).
- NTC 4779 de 2007: Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de Estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) (NTC, 2007).

- NTC 4574 de 2007: Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (NTC, 2007).
- GTC 155 de 2007: Guía para la evaluación y prevención de microorganismos en planta de alimentos: *Listeria monocytogenes* (GTC, 2007).
- NTC 6127-1 de 2015: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Campylobacter* spp. Parte 1: Método de detección (NTC, 2015).
- NTC 1325 de 2013: Industrias alimentarias. Productos cárnicos procesados no enlatados.
- ISO/IEC 17025 de 2017: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

5. METODOLOGÍA

5.1. Recepción de las cepas de referencia

Para realizar la recepción de las cepas, se alistarán todo el material necesario con la finalidad de que esta quede registrada de forma correcta en toda la documentación.

Se diligenciará un formato de inspección de medios de cultivo, reactivos y materiales consumibles en donde se podrá saber si existen causales de rechazo o no y se asignará un código interno consecutivo a cada cepa ejemplo del código: 1, 2, 3, 4, 5,6... etc.

Se revisará el certificado de identificación de la cepa en donde se debe dejar claro: ● Nombre e identificación ● Número de colección de origen ● Fecha de vencimiento ● Condiciones para su óptimo mantenimiento, conservación y reconstitución ● Bioseguridad.

Se archivará el certificado de análisis de la cepa de referencia, el cual no deberá usarse hasta que no se haya verificado que cumple con las especificaciones o requisitos solicitados, se deberá evitar cualquier contacto directo con el microorganismo o sus aerosoles, en especial la inhalación o el contacto con piel y ojos.

Se almacenarán las cepas a una temperatura de 2 a 8 °C o como lo indica el proveedor en el cuarto frío hasta su uso.

5.2. Codificación de las cepas

Al llegar las cepas de referencia, se les asignará un código consecutivo indicado con el Número 01, se les colocará las siglas del género y la especie del microorganismo y el número de la colección para las cepas de referencia para que estas queden como cepas stock.

Se codificarán las cepas de reserva y de trabajo; se le asignará el mismo código de la cepa de referencia, rotulándolas con las letras CS que corresponde a cepas stock seguido por las letras R1 que corresponde a el repique N° 1.

A las cepas de reserva: se les asignarán los mismos códigos de las cepas de referencia, seguido con las letras CR, cepas de reserva y por las letras R2 que corresponde a el repique N° 2. Que van a temperatura de conservación -20°C.

Se les asignarán las letras CT que corresponde a cepas de trabajo seguido por las letras R3 que corresponde al repique N° 3 que van a temperatura de refrigeración.

Esta información debe ser registrada en el formato “Inventario cepas de referencia, de reserva y de trabajo”.

5.3.Reconstitución de las Cepas de Referencia

La reconstitución de la cepa dependerá de la naturaleza del microorganismo, es decir, de si son microorganismos fastidiosos y no fastidiosos.

Para la reconstitución de los microorganismos no fastidiosos se realizará atendiendo las especificaciones del proveedor, de la siguiente manera:

Primero se alistará el empaque que contiene el asa bacteriológica en gel de la cepa de referencia y el medio de cultivo; La manipulación de la cepa se ejecutará utilizando los elementos de bioseguridad y siguiendo lo estipulado en la recepción de las cepas (verificar el número de las cepas y el nombre del cultivo).Posteriormente se calentará el medio de cultivo apropiado a 35 -37°C, y se retirará el asa del empaque y se tomará por el mango, disponiéndola sobre la superficie cálida y húmeda del agar y durante 10 a 15 segundos de esta manera se permitirá la absorción de la humedad. Posteriormente, se sembrará por agotamiento. (*Se puede sembrar hasta cinco placas con la misma asa.) Se incubarán las placas en una atmosfera y temperatura adecuada para el óptimo crecimiento del microorganismo.

Por otra parte, para la reconstitución de microorganismos fastidiosos se recomienda el siguiente procedimiento:

Dónde: Se retirará la envoltura del asa y se cortara con una tijera estéril el eje de la argolla en un tubo que contenga 0.5 a 1.0 ml de BHI e Incubará entre 35 a 37°C hasta que la película se disuelva completamente (aproximadamente una hora). Luego se agitará el tubo suavemente para suspender el microorganismo e inocular en el medio apropiado sembrando por agotamiento; las placas se incubarán en una atmosfera y temperatura adecuada para el crecimiento óptimo del microorganismo.

Observación: La mayoría de los organismos crecen en 24 a 48 horas en las condiciones adecuadas. Sin embargo, algunos presentan una fase de latencia considerable y deben incubarse durante 24 horas más.

El número de repiques (resiembra) a partir de la cepa de referencia ha de ser limitado, aceptándose hasta 5 pases como máximo a partir de la cepa o semilla original de referencia, de acuerdo con lo descrito en el Boletín de información técnica TIB.081 “Recommended Growth Requirements ATCC”.

Se debe realizar control de promoción de crecimiento y selectividad (diluciones seriadas hasta 10^{-8}) y pureza (coloración de Gram).

5.4. Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza

La promoción de crecimiento y selectividad se realizará de acuerdo a lo documentado en el instructivo de preparación de medios de cultivo y reactivos.

5.4.1. Promoción del crecimiento

Se sembrará 100 μ l de la cepa en 9 ml de BHI o caldo caso, Incubándose por 24 horas a 37°C; Transcurrido este tiempo se realizarán diluciones seriadas de la cepa de 10^{-1} hasta 10^{-8} en tubos con 9 ml de agua peptonada. Luego se Sembrarán todas las diluciones en agar caso, aplicando la técnica de profundidad (dos cajas por dilución) e Incubar las cajas a 37°C por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se realizará el recuento de las UFC.

NOTA:

El cálculo de promoción del crecimiento se realiza dividiendo las UFC inoculadas entre las UFC recuperadas.

Para la prueba de promoción y crecimiento, se inocula entre 10 y 100 UFC para determinar el log de recuperación, la diferencia entre los logaritmos de ser $> 0 = 0,5 \text{ Log}$.

Se registrará en el formato correspondiente “Verificación de esterilidad, promoción de crecimiento y selectividad de los medios de cultivo mediante el uso de Cepas ATCC” (Ver anexo 1).

5.4.2. Pureza

Este control se realizará con el propósito de comprobar la pureza con la cual llega la cepa al laboratorio, lo cual debe hacerse una vez la cepa se encuentra reconstituida, donde se tomará una colonia del medio en la cual fue reconstituida y se le realizarán repiques en un medio de baja selectividad hasta 3 repiques en donde se esperará obtener colonias independientes y pruebas primarias de pureza: coloración de Gram, características morfológicas macroscópicas, catalasa y oxidasa.

5.4.2.1. Estabilidad morfológica mediante tinción de Gram y características morfológicas en medio sólido.

El análisis de estabilidad morfológica mediante tinción de Gram y características morfológicas en medio sólido se realizará del tubo de agua peptonada utilizado para realizar las diluciones seriadas, se tomará una gota de medio y se ubicará en la mitad de la lámina, donde se esperará que seque para posteriormente, fijar la muestra por calor, pasándola rápidamente (tres veces) por el mechero. Y de esta manera realizar la tinción de Gram.

Para la determinación de las características morfológicas se observará el crecimiento en cada agar respectivo; el cual, se ha inoculado de la suspensión (agua peptonada). Se incubará a 37°C/48H, y se observarán colonias características

5.5. Conservación de cepas.

5.5.1. Conservación de cepas semi stock o de referencia (En nitrógeno líquido -195°C).

La conservación de las cepas de referencia en nitrógeno líquido a -195°C, se debe preparar un frasco Schott con 100 ml de caldo BHI, al cual, se le inoculara una asada de la cepa stock. Al tener los 100 ml puros de la cepa de referencia se le adicionara 20 ml de glicerol estéril, obteniendo una solución de la cepa con 20% de glicerol. Posteriormente, se dispensan 1000 µl de la cepa en suspensión en viales de 2 ml por cada cepa y 12 viales por cada microorganismo a evaluar de los cuales 9 corresponderán a la viabilidad de 30, 90 y 120 días (Método por triplicado). Luego se iniciará la congelación de los crioviales de forma secuencial (guardar todos los crioviales en refrigeración con una temperatura de 2 a 10°C por 30 minutos, posterior a esto, guardar en congelador con temperatura de -10 a -20°C por dos horas. Finalmente se guardarán los viales en el tanque de nitrógeno líquido a -195.

Nota: Se deberá rotular los crioviales con el código asignado, la fecha más la sigla CS-R1 que significa cepa Stock repique uno, y el número de vial del total por ejemplo vial 4 de 50 realizados. Esto con el fin de utilizarlos de forma ordenada.

5.5.2. Conservación de cepas de reserva R2 (En congelación a -20°C).

La conservación de las cepas de reserva R2 se realizará retirando del tanque de nitrógeno el criovial (por orden numérico), utilizando los elementos de

protección. El transporte del criovial se realizará depositándolo en un contenedor con tapa para evitar su contaminación al ser transportado a la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se encenderá el baño serológico a 37°C, esperar que el agua tenga esta temperatura para proceder a la descongelación del criovial (después de 5 a 10 minutos la cepa de reserva estará completamente descongelada).

Agregar 50 ml de caldo BHI en un frasco Schott y suspender la cepa de reserva descongelada con mucha precaución de no contaminar la cepa al abrir el vial. Realizar tres enjuagues del vial con el medio para lavar todas las células posibles y homogenizar el frasco.

Incubar el frasco de la solución madre.

Las temperaturas de incubación para los microorganismos utilizados son:

- *Salmonella thyphimurium* 37°C/24hs
- *Pseudomonas aeruginosa* 37°C/24hs
- *Escherichia coli* 37°C/24hs
- *Staphylococcus aureus* 37°C/24hs
- *Listeria monocytogenes* 37°C/24hs

Posterior al tiempo de incubación se realizarán controles de promoción de crecimiento, selectividad y pureza a la cepa reconstituida por medio de diluciones seriadas y coloración de Gram. Los resultados obtenidos serán registrados en el formato “verificación de esterilidad, promoción de crecimiento y selectividad de los medios de cultivo”.

Al realizar la revisión de las cepas, se debe adicionar el crioprotector (10 ml de glicerol), que en nuestro caso será al 20%.

Finalmente, se deben rotular los crioviales con el código asignado, la fecha más la sigla CR-R2 que significa cepa de reserva repique dos, y el número de vial del total, por ejemplo, vial 1 de 96 realizados; esto con el fin de utilizarlos de forma ordenada; después de ello, tomar 1000 µl del frasco Schott de 50 ml depositarlos en los crioviales designados de manera cuidadosa, siempre cambiando de punta si se utiliza micropipeta.

Cada criovial con la cepa será reconstituido mensualmente a un caldo BHI para dar origen a las cepas de trabajo R3 mantenidas en nevera.

5.5.3. Conservación de cepas de trabajo por métodos alternos R3 (En refrigeración 2-8 °C).

La cepa de trabajo se deslga de una cepa de reserva (R2 almacenada a -20°C) y su finalidad es ser usada diariamente en el laboratorio para la verificación de la producción tanto de medios de cultivo como de reactivos.

Dichas cepas, se conservarán como se describe a continuación:

Se sacará la cepa de reserva del congelador a -20° (descongelarla a temperatura ambiente); se rotularán los tubos de ensayo con la siguiente información: El código asignado para la cepa, la fecha del repique, las siglas CT-R3 (que significa cepa de trabajo repique tres) y la firma del responsable del repique. Se agregará la cepa en un caldo BHI o caso de 9 ml con mucha precaución de no contaminar. Mezclar suave y constantemente. Se incubará a la temperatura indicada para cada microorganismo.

Nota: La cepa de *Staphylococcus aureus*, además de repicarse en medio de cultivo líquido se repicará en cajas de agar sangre para posteriores cultivos y se codificará de la misma manera.

La temperatura de almacenamiento para las cepas de trabajo oscila entre 2 a 8°C y se mantendrán en el cuarto frío en un compartimento especial para esta actividad.

Para el uso de la cepa de trabajo se deberá ser muy riguroso con todas las medidas de bioseguridad y esterilidad, dado que es un inóculo que estará en constante manipulación, manteniendo la vida útil del mismo por un mes.

5.6. Evaluación de los métodos de conservación

La evaluación se realizará mediante la pureza y viabilidad de cada microorganismo en un intervalo de tiempo (30, 90 y 120 días) de conservación.

5.7. Pureza

Para el ensayo de la pureza se realizará por observación macroscópica de las colonias crecidas (su morfología en cuanto a: forma, tamaño y color) y las características microscópicas teñidos por el método de tinción de Gram.

También se realizarán otras pruebas para una identificación más confiable utilizando la prueba rápida de identificación Api 20 E y Api 20 NE.

5.8. Viabilidad de los métodos de conservación en bacterias Grampositivas y Gramnegativas

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de los métodos de conservación se hará un seguimiento a las cepas conservadas donde se medirá un recuento inicial de cultivo y recuentos T1, T2 y T3 (tiempos de conservación mencionados anteriormente) (Pedroza *et al.*, 2007).

Así mismo, para su determinación, se realizarán diluciones desde 10^{-2} a 10^{-8} en agua peptonada, sembrándose por duplicado, bajo la técnica de profundidad en agar caso, las tres últimas diluciones, incubándose a la temperatura ideal para cada microorganismo.

Para el recuento de las diluciones se multiplicará por el factor de dilución correspondiente para obtener el resultado en UFC/ml. A las 48 horas de conservación se evaluará el número de células viables para cada una de las cepas.

5.9. Actividades que determinan la calidad microbiológica de la carne de pollo

El proceso inicia desde la obtención del huevo y continua con la cría y levante del pollo, su etapa de producción y finalmente se dirige a la planta de beneficio y desprese, donde se procesa para la obtención de derivados cárnicos crudos y cocidos. Por ende, reconociendo que cada etapa es crucial para garantizar la calidad del producto, la empresa cuenta con un laboratorio microbiológico donde se realizan los análisis correspondientes; por consiguiente, todas las muestras son direccionadas allí, transportándose en condiciones de refrigeración y embalaje adecuado para minimizar y evitar su ruptura, derrame o contaminación, cumpliendo con lo establecido en la NTC 4092/2009. El horario para la recepción de las muestras en el laboratorio es de 7:00 a 10:00 a.m. y 1:00 a 3:00 p.m.

Para introducirnos al tema, en los meses de enero a marzo se puede evidenciar que se realizó un total de 4.005 muestras con el fin de determinar la calidad microbiológica de la carne de pollo y productos procesados crudos y cocidos, desglosado a continuación:

5.9.1. Parámetros microbiológicos.

5.9.1.1. Enjuagues.

Según Resolución Ministerio de Salud y Protección Social N° 4287 de 2007 se debe realizar la determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

5.9.1.2. Productos crudos.

Según NTC 3644 -2 de 2018 se debe realizar la determinación de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Campylobacter* spp.

5.9.1.3. Productos procesados cocidos.

Según NTC 1325 de 2008 se debe realizar la determinación de Aerobios mesófilos, coliformes, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, Esporas *Clostridium* sulfito reductor, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

5.9.2. Metodología para la preparación de las muestras

Según el manual interno del laboratorio microbiológico de la empresa del sector avícola las muestras son preparadas como se describen a continuación:

5.9.2.1. Preparación de la muestra

Se tomó 25 g de la muestra y adicionó en 225 mL de Agua peptonada tamponada ISO, a continuación, se homogenizó en Stomacher por 30 segundos e incubo a 37°C si son productos cocidos y a 42°C si son productos crudos (Este procedimiento se lleva a cabo para la realización de todos los parámetros microbiológicos excepto *Listeria monocytogenes*).

5.9.2.2. Preparación de las muestras de alimentos para la determinación de *Listeria monocytogenes*.

Se tomó 25 g de la muestra y se adicionó en 225 ml de Caldo Denim Fraser incubando a 37°C durante 24 horas.

5.9.3. Metodología para la determinación microbiana.

5.9.3.1. *Salmonella* spp.

Se realizó un pre-enriquecimiento en Agua Peptonada Tamponada ISO, se llevó a incubar a 37°C/24h. Posteriormente, se analizan las muestras aplicando la metodología de detección molecular en donde se transfirió 20 µl del caldo previamente incubado. Este se llevó a una plancha de calentamiento a 100°C durante 15 minutos. En donde se retiró el cartucho y se pasó a una plancha de enfriamiento por 5 minutos. Posteriormente, se tomó 20 µl y transferir al tubo de reacción. Luego se ubicó en el equipo MDS100 del sistema de detección molecular 3M™ para iniciar la corrida.

Las muestras arrojadas como positivas se confirman por el método tradicional de la siguiente manera: se transfirió 100 µl de la muestra original incubada previamente, a un tubo que contiene 10 ml de caldo Rappaport, se incubó a 41°C por 24 horas, pasado este tiempo se repicó en agar XLT4 e incubó a 37°C por 48 horas.

5.9.3.2. *Listeria monocytogenes*.

La muestra se prepara como se indicó pasos arriba. De esa muestra incubada: Se transfirió al pocillo de lisis 20 µl del caldo previamente incubado; posteriormente se pasó a la plancha de calentamiento a 100°C durante 15 minutos, luego se retiró el cartucho y paso a una plancha de enfriamiento por 5 minutos. Posteriormente, se tomó 20 µl y se transfirió al tubo de reacción; donde se ubicó en el equipo MDS100 del sistema de detección molecular 3M™ para iniciar la corrida.

5.9.3.3. *Campylobacter* spp.

Se realizó un enriquecimiento en caldo CampyFood, incubando a 42°C por 24 horas.; posteriormente se transfirió 20 µl del caldo previamente incubado al pocillo de lisis. Luego se pasó a la plancha de calentamiento a 100°C durante 15 minutos; se retiró el cartucho y se pasó a una plancha de enfriamiento por 5 minutos. Posteriormente, se tomó 20 µl y transfirió al tubo de reacción. Para posteriormente ser ubicado en el equipo MDS100 del sistema de detección molecular 3M™ para iniciar la corrida.

Para la confirmación:

Se repicó por agotamiento en agar CampyFood, incubándose a 42°C en atmósfera microaeróbica; las colonias presuntivas se confirmaron con el Kit aglutinación de látex.

5.9.3.4. Aerobios Mesófilos, Coliformes y *Escherichia coli* y Bacterias ácido lácticas.

Se tomó 1 ml de la dilución (Dependiendo la matriz alimentaria) e inoculó en Petrifilm3M™ (AC para Mesófilos, EC para Coliformes y *E. coli* y LAB para bacterias ácido lácticas), distribuyendo la suspensión y llevando a incubación 37°C/48H. (AOAC, 1994).

5.9.3.5. Esporas de *Clostridium* sulfito reductor.

Se transfirió 1 ml de la dilución a un tubo estéril vacío, posteriormente se llevó a calentamiento a 80°C por 10 minutos, transcurrido este tiempo se realizó choque térmico, se procedió a agregar una primera capa de Agar SPS de 15 ml, dejando solidificar, finalizando con una segunda capa de 10 mL e incubando a 37°C/48h.

5.9.3.6. *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva.

Se sembró 1 ml en placa compact Dry XSA, e incubó a 37°C/48h. Las colonias verdes azuladas se pasan a agar sangre sembrando por agotamiento e incubando a 37°C/24H; se confirman transfiriendo una colonia a un tubo estéril con 400 µl de plasma de conejo hidrolizado e incubando a 37°C/4h.

5.9.4. Superficies

5.9.4.1. Determinación de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, hongos.

Las muestras ingresan al laboratorio en caldo neutralizante (Letheen). Donde se tomó de la muestra 1 ml e inoculó en Petrifilm3M™ EC, distribuyendo la suspensión (para determinar coliformes totales y *E. coli*); se tomó nuevamente 1 ml y se sembró en Petrifilm3M™ RAC (para aerobios mesófilos) e incubando a 37°C/24H. Para la determinación de hongos se realizó mediante la exposición de Agar Sabouraud al ambiente por 10 minutos incubando a temperatura ambiente por 5 días.

5.9.5. Aguas

Tanto en el área de diagnóstico como en el área de alimentos, se tiene programado semanalmente el envío de dichas muestras debido que es el suministro de las plantas y granjas que hacen parte de la empresa; analizándose a través de la técnica de filtración por membrana para la detección de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*.

Por otra parte, las muestras de agua sin tratamiento son analizadas mediante la técnica de número más probable para la determinación de coliformes totales y *E. coli*, realizándose tres diluciones de la muestra (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) para inocular en los caldos LSM e incubar a 37°C/48H; además, se realiza detección de *Salmonella* spp., tomando 1 ml de la muestra en 9 ml de agua peptonada tamponada ISO y se incuba a 37°C/24H, para luego ser analizada aplicando la metodología de detección molecular.

5.9.6. Hielos

La detección de coliformes totales y *E. coli* se realizó mediante la técnica de número más probable (NMP), incubándose a 37°C por 48 horas.

Para la determinación de aerobios mesófilos se inoculó 1 ml de la dilución 10^{-1} en placa de Petrifilm3M™ AC.

5.9.7. Identificación de microorganismos mediante del sistema de pruebas rápidas API 20E

Se empleó para identificar microorganismos aislados en muestras sembradas previamente, por ejemplo, de: tracto respiratorio y digestivo de aves de corral, así como de muestras de las superficies de las vacunadoras.

Se tomó una colonia bien aislada de cada microorganismo y Re-suspendió homogéneamente en 5 ml de solución salina (1 % de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Luego se distribuyó la suspensión del inóculo en cada microtubo, llenándose hasta la cúpula los microtubos de CIT, VP y GEL con el inóculo. Se le adicionó parafina, hasta llenar la cúpula de los microtubos de ADH, LDC, ODC, URE, H₂S (con el fin de generar atmósfera de anaerobiosis) Posteriormente, se colocó la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente, se le agregó agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda e incubó a 37°C/ 18H – 24H.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Instructivo de Preparación, manipulación y almacenamiento de cepas de referencia.

<p>INSTRUCTIVO I-LAM-001A PREPARACIÓN, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE CEPAS DE REFERENCIA 15/08/2020/ V. 1</p>
<p>1. OBJETO</p> <p>Este instructivo establece requerimientos, instrucciones y cuidados a seguir para el buen manejo interno cepas de referencia, previniendo el riesgo de contaminación y garantizando la viabilidad de las mismas.</p>
<p>2. DEFINICIONES</p> <p>ATCC: sigla del AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) correspondiente a una organización sin fines de lucro que se ocupa de la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia, líneas celulares y otros materiales para el estudio e investigación en ciencias de la vida.</p> <p>Bacteria: Nombre que reciben los organismos unicelulares y microscópicos, que carecen de núcleo diferenciado y orgánulos interno. Se reproducen por división celular sencilla o por esporas.</p> <p>Cepa: Grupo poblacional de células emparentadas, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia proviene de una única célula.</p> <p>Cepa de referencia: Microorganismo con características fenotípicas y genotípicas conocidas, definidos al menos hasta nivel de género y especie de origen conocido (ISO 11133-2: 2000). Obtenida de una colección ATCC.</p> <p>Cepa de reserva: Toda cepa idéntica obtenida mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.</p> <p>Cepa de trabajo: Cepa obtenida del subcultivo primario de una cepa de reserva.</p> <p>Cepa ATCC: Estándar de referencia biológico a nivel de microorganismos que se emplean para el desarrollo de pruebas y</p>

Figura 4. Instructivo de preparación, Manipulación y Almacenamiento de cepas de referencia.

6.2. Recepción de las cepas de referencia

A continuación, en la Tabla 2 se consignará la información acerca de la recepción de las cepas.

Tabla 2. Inventario de Cepas de referencia, de reserva y de trabajo.

Inventario Cepas de Referencia, de Reserva y Trabajo							Código					
							Rev:					
							Ver:					
							Página:					
Código Interno	Microorganismo	Nº De Colección	Fecha de recepción en el Laboratorio	Condiciones de Almacenamiento y Conservación	Fecha de reconstitución de la cepa	Fecha de retiro de la cepa	Entradas	Salida	Saldos	Responsable	Firma	
							Cantidad	Cantidad	Cantidad			

6.3. Codificación de las cepas

En las siguientes tablas 3 – 6 se observa la forma en la cual se deberá rotular las cepas de referencia según el número de repique y condición de almacenamiento.

Tabla 3. Codificación de las Cepas de referencia.

Codificación de las Cepas Referencia	
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block;"> 01-S, t.14028 </div>	Donde Corresponde:
	01: Consecutivo
	S, t: Es la sigla del género y la especie (<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028)
	14028: Número de colección para las cepas de referencia

Tabla 4. Codificación de las Cepas Stock (R1).

Codificación de las Cepas Stock (R1)	
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block;"> 01 - S,t. 14028. CS-R1/1 De 50 </div>	Donde Corresponde:
	01: Consecutivo
	S, t: Es la sigla del género y la especie (<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028).
	14028: Numero de colección para las cepas de Referencia
	CS: Cepas Stock
	R1: Repique 1
	1 de 50: Numero del vial.

Tabla 5. Codificación de las Cepas de Reserva en Congelador -20 (R2).

Codificación de las Cepas de Reserva en congelador - 20 (R2)	
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> 01 - S,t. 14028. CR-R2/1 De 50 </div>	Donde Corresponde:
	01: Consecutivo
	S, t: Es la sigla del género y la especie (<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028).
	14028: Numero de colección para las Cepas de Referencia
	CR: Cepas de Reserva
	R2: Repique 2
	1 de 50: Consecutivo 1 de 50 viales (Cepa de Reserva).

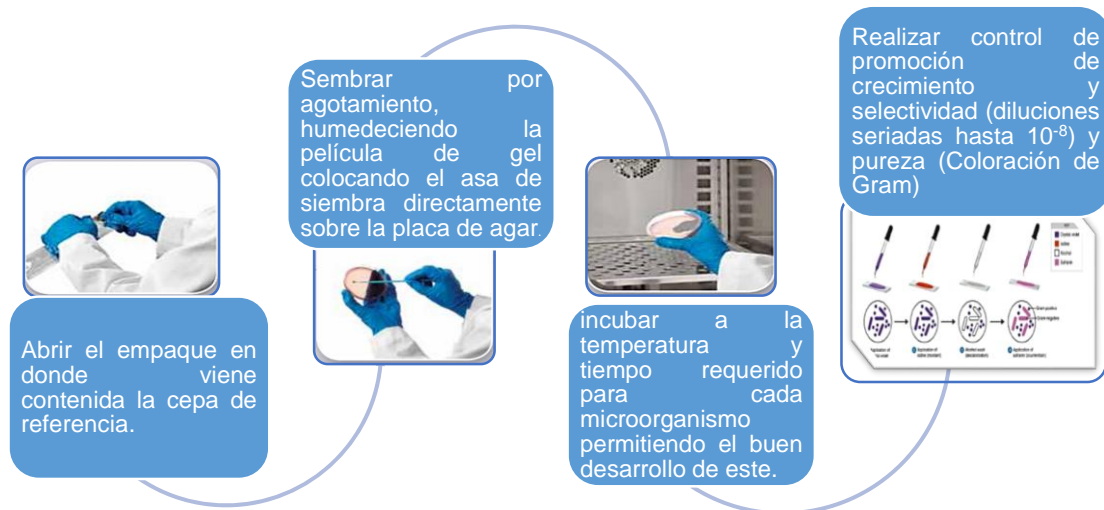
Tabla 6. Codificación de las Cepas de Trabajo Refrigerador de 2 - 8°C (R3).

Codificación de las Cepas de Trabajo Refrigerador de 2 – 8°C (R3)	
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> 02 - S,t. 14028. Fecha: CT-R3 Firma: </div>	Donde Corresponde:
	02: Consecutivo
	S, t: Es la sigla del género y la especie (<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028).
	14028: Numero de colección para las Cepas de Referencia
	Fecha: Repique de la cepa en caldo de cultivo.
	R3: Repique dos de trabajo
	Firma: Responsable de realizar el repique de la cepa.

6.4 Reconstitución de las cepas de referencia

La reconstitución de las cepas se realizará según las especificaciones del proveedor dependiendo del tipo del microorganismo, si este es un microorganismo fastidioso es decir de difícil desarrollo. Debido a esto se proponen dos métodos de siembra:

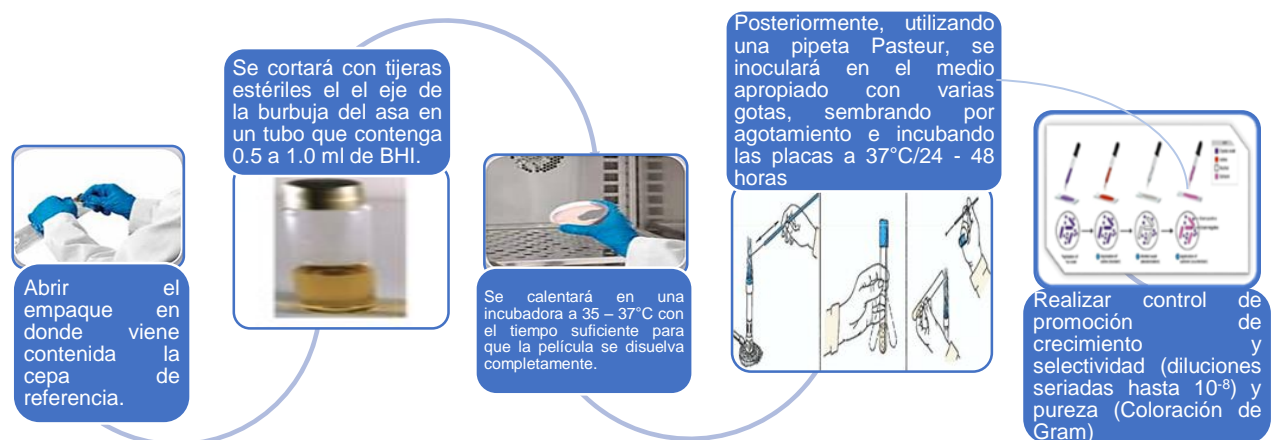
6.4.1 Método de siembra directa.



Flujograma 1. Método de siembra directa.

Tomado en: ThermoScientific (En línea). Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Culti-Loops-Brochure-ES.pdf>

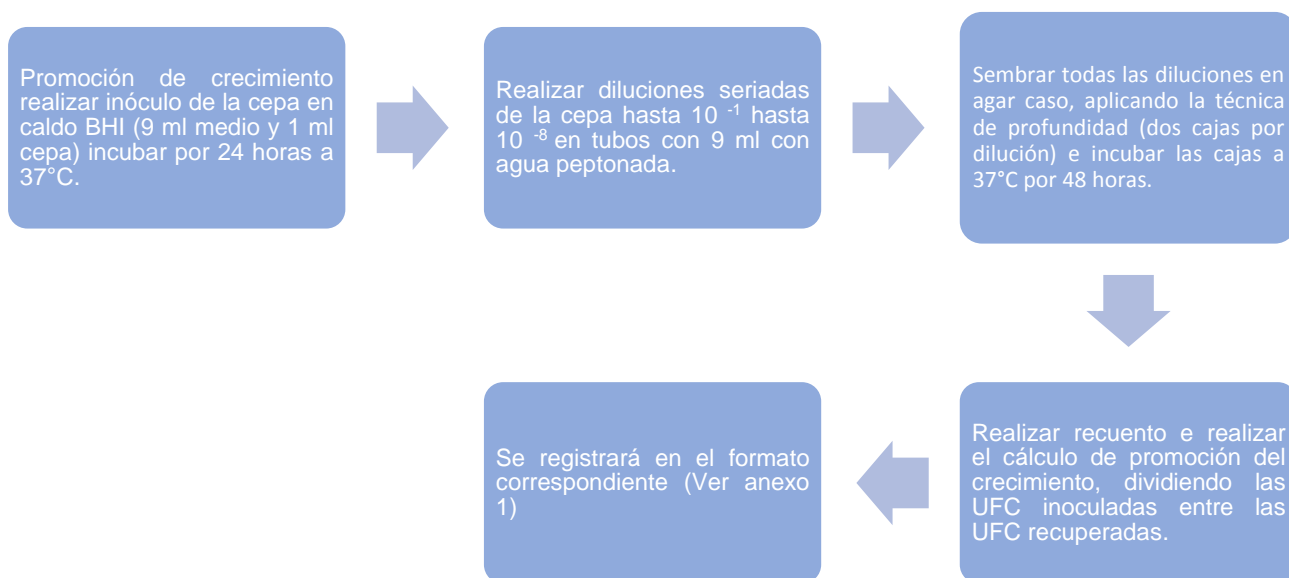
6.4.2 Método de siembra (en caldo) Indirecto.



Flujograma 2. Método de siembra (en caldo) Indirecto.

Tomado en: ThermoScientific (En línea). Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Culti-Loops-Brochure-ES.pdf>

6.5 Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza

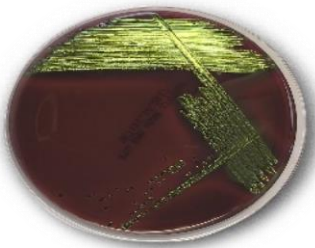



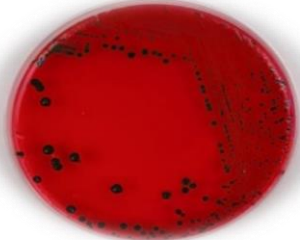


Flujograma 3. Control de calidad promoción de crecimiento, selectividad y pureza.


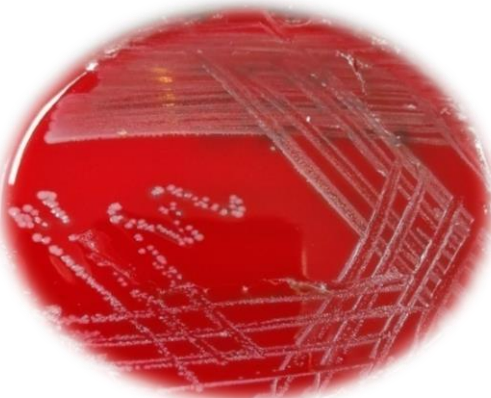
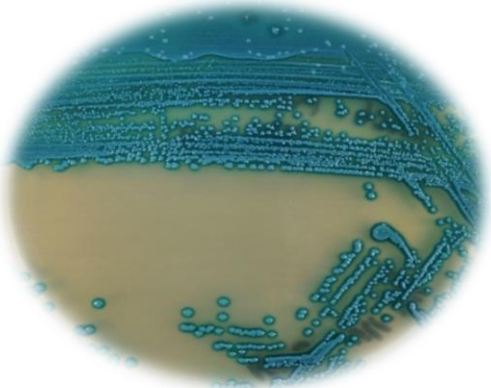
6.5.1 Características morfológicas en medio sólido

En la Tabla 7 se observan las características macroscópicas en medios de cultivos sólidos de las cepas de referencia que se encuentran en el laboratorio de calidad.

Tabla 7. Características Macroscópicas en medios sólidos.

Medio	Características macroscópicas de <i>Escherichia coli</i>
<p data-bbox="293 1482 423 1514">Agar EMB</p>  <p data-bbox="529 1818 695 1850">Fuente: Autor</p>	<p data-bbox="954 1650 1450 1745">Colonias aisladas, medianas, circulares, convexas, moradas, contorno verde metálico, bordes redondeados.</p>

<p>Agar Mac Conkey</p>  <p>Fuente: Autor</p>	<p>Colonias aisladas, medianas, circulares, Convexas, bordes redondeados, lactosa positiva lo que les da la coloración rosada.</p>
<p>Medio Características macroscópicas de <i>Salmonella</i> spp.</p>	
<p>Agar XLT4</p> 	<p>Las colonias de <i>Salmonella</i> spp. Metabolizan el tiosulfato para producir sulfuro de hidrógeno, lo que conduce a la formación de colonias con centros negros.</p>
<p>Agar MacConkey</p>  <p>Fuente: Autor</p>	<p>Las colonias de <i>Salmonella</i> spp. no tienen la capacidad de degradar la lactosa presente en el medio, por lo cual no presentan ninguna coloración y se identifican como colonias lactosa negativa.</p>
<p>Medio Características macroscópicas de <i>Pseudomonas</i> spp.</p>	
<p>Agar Mueller Hinton</p> 	<p>Las colonias de <i>Pseudomonas</i> spp. son redondas y lisas con un color verdoso fluorescente; suele producir el pigmento azulado no fluorescente piocianina, que se difunde en el agar.</p>

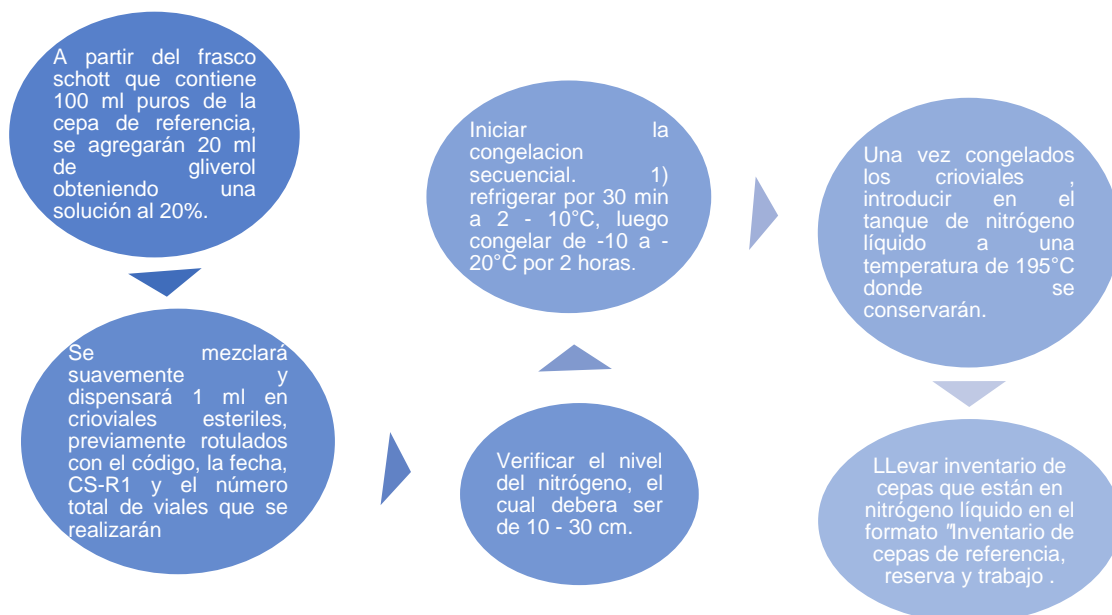
Medio	Características macroscópicas de <i>Staphylococcus aureus</i>
<p data-bbox="293 254 456 281">Agar Sangre</p>  <p data-bbox="529 661 695 688">Fuente: Autor</p>	<p data-bbox="954 443 1451 590">Colonias aisladas de 1 -3 mm, cremosas, convexas y de bordes lisos. La mayoría de las cepas de <i>S. aureus</i> producen β hemólisis, es decir un halo blanquecino alrededor de la colonia.</p>
Medio	Características macroscópicas de <i>Listeria monocytogenes</i>
<p data-bbox="293 846 456 873">Agar Sangre</p>  <p data-bbox="529 1304 695 1331">Fuente: Autor</p>	<p data-bbox="954 1031 1451 1150">Colonias aisladas son suaves, ligeramente convexas, con bordes regulares, traslúcidos y una pequeña zona de β hemólisis.</p>
<p data-bbox="293 1371 418 1398">Agar HCL</p>  <p data-bbox="529 1850 695 1877">Fuente: Autor</p>	<p data-bbox="954 1581 1451 1644">Colonias aisladas de color azul- verdoso con halo opalescente</p>

6.5.2 Pureza

Este control se realizará una vez la cepa se encuentra reconstituida, donde se tomará una colonia del medio en la cual fue reconstituida y se le realizarán repiques en un medio de baja selectividad hasta 3 repiques en donde se esperará obtener colonias independientes y pruebas primarias de pureza: coloración de Gram, características morfológicas macroscópicas, catalasa y oxidasa.

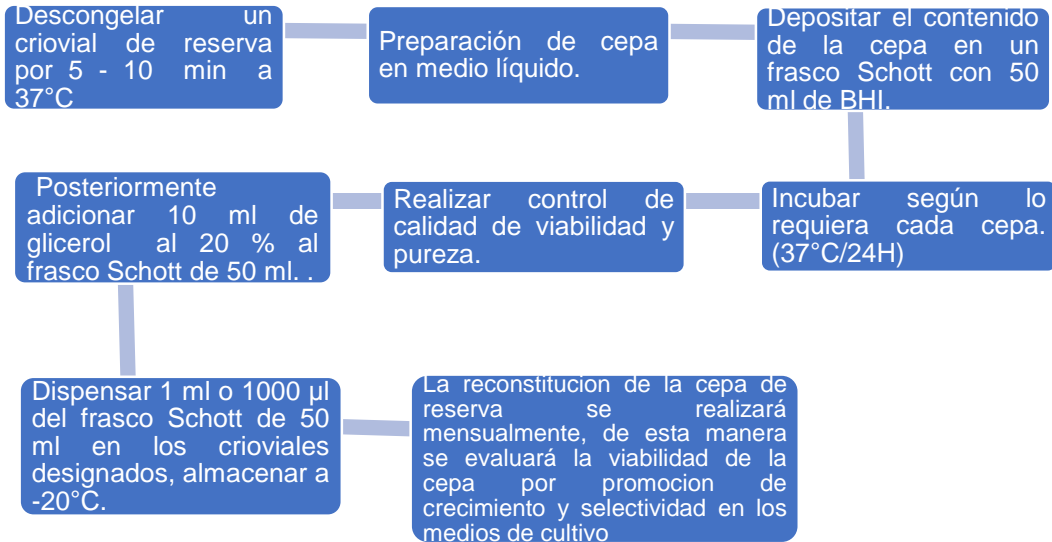
6.6. Conservación de cepas.

6.6.1 Conservación de cepas semi stock o de referencia (en nitrógeno líquido -195°C).



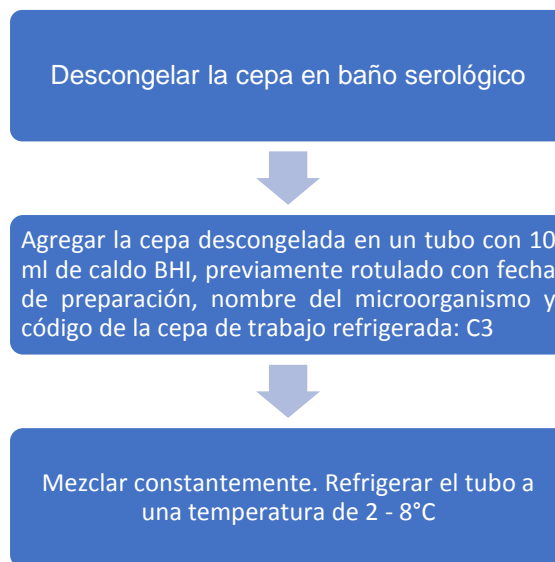
Flujograma 4. Conservación de cepas semi stock o de referencia (en nitrógeno líquido -195°C).

6.6.2 Conservación de cepas de Reserva R2 (en congelación a -20°C)



Flujograma 5. Conservación de cepas de Reserva R2 (en congelación a -20°C).

6.6.3 Conservación de cepas de trabajo (R3) (en refrigeración 2 - 8 °C)



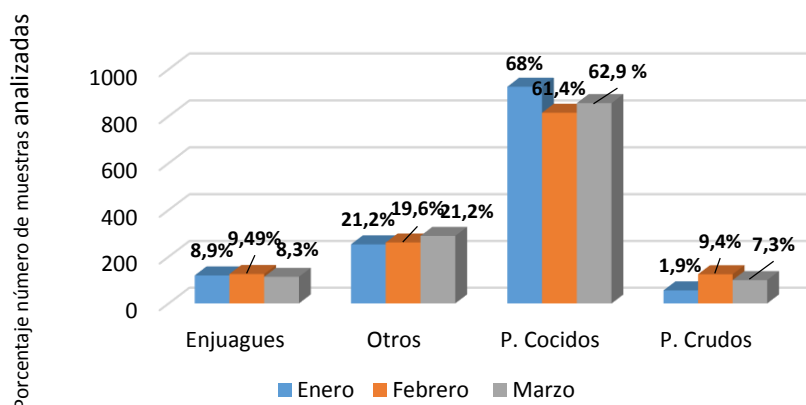
Flujograma 6. Conservación de cepas de trabajo R3 (en Refrigeración a 2 -8°C).

6.7. Actividades que determinan la calidad microbiológica de la carne de pollo y derivados cárnicos.

6.7.1. Porcentaje de número de análisis realizados por mes.

El total de muestras procesadas entre el periodo mencionado fue de 4.005, correspondiendo a los siguientes tipos de muestras: 1) Enjuagues, 2) derivados cárnicos cocidos, 3) derivados cárnicos crudos y 4) entre otros.

Como se puede observar en la Gráfica 1, el total de muestras procesadas corresponde y se fracciona en los meses de enero, febrero y marzo; donde, además, se encuentra consignado el número de muestras analizadas al mes según el producto o tipo de muestra.



Gráfica 1. Porcentaje de número de análisis realizados por mes.

Fuente: Autor

Para el mes de enero se analizaron 1.355 muestras, encontrándose que el mayor número corresponde a productos cárnicos cocidos con un valor de 926 muestras (es decir un 68% de muestras analizadas), seguido de las muestras de enjuagues que corresponden a 120 (divisando un 8,9%) y finalmente los productos procesados crudos con un total de 26 (correspondiente al 1,9%).

Por otra parte, puede apreciarse esta misma tendencia para los meses de febrero y marzo; no obstante, en estos meses se puede observar que el número de muestras de productos cárnicos cocidos se redujo a 815, es decir, a un 28%

de muestras procesadas y se aumentaron los productos cárnicos crudos a un 44%. Para el caso de los enjuagues se mantuvo en la misma proporción.

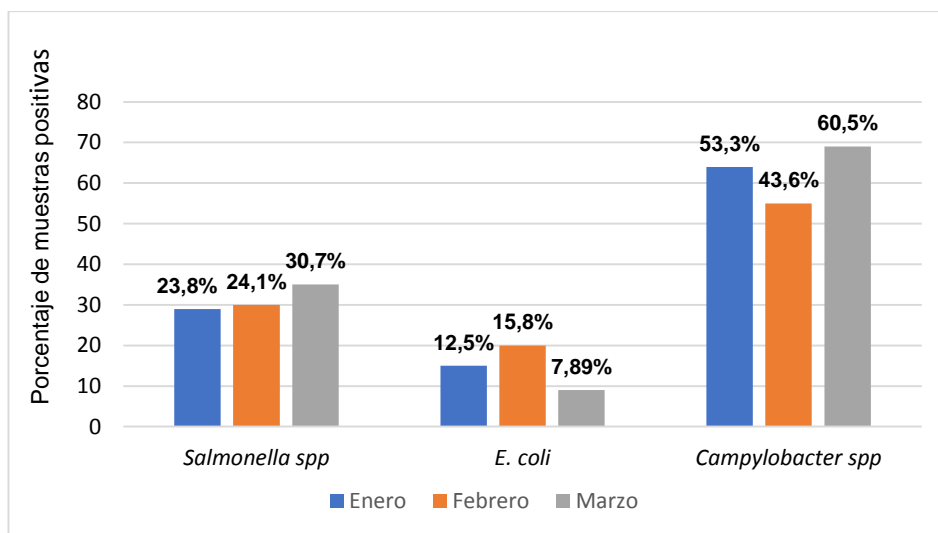
Con estos hallazgos se correlaciona con los históricos del laboratorio y se estudia que las variaciones en los productos analizados en el laboratorio microbiológico pueden ser atribuidas a las necesidades comerciales de la época, puesto que todo el año fluctúan, encontrándose un alza de producción en los meses de noviembre y diciembre.

6.7.2. Porcentaje de número de muestras de enjuagues de la canal del ave de corral positivas.

A continuación, se observa el número de muestras procesadas de enjuagues positivas en los meses anteriormente mencionados.

Como se presentó en el gráfico anterior, la totalidad de las muestras procesadas respecto a enjuagues fue de 360, distribuyéndose de la siguiente manera: 1) enero: 120, 2) febrero: 126 y 3) marzo: 114.

En la Gráfica 2, se pretende evidenciar la distribución en cuanto al agente etiológico aislado; encontrándose que el comportamiento en los tres meses (enero, febrero y marzo) estudiados es homogéneo, coexistiendo una prevalencia de *Campylobacter* spp., con un 53.3 %, 43.6 % y 60.5 % (64, 55 y 69 muestras), seguido de *Salmonella* spp., con un 24.1 %, 23.8 % y 30.7 % (29, 30 y 35 muestras) y posteriormente *Escherichia coli* con un 12.5 %, 15.8 % y 7.89 % (15, 20 y 9 muestras) en su orden respectivo.



Gráfica 2. Porcentaje de número de muestras de enjuagues de la canal del ave de corral positivas.

Fuente: Autor.

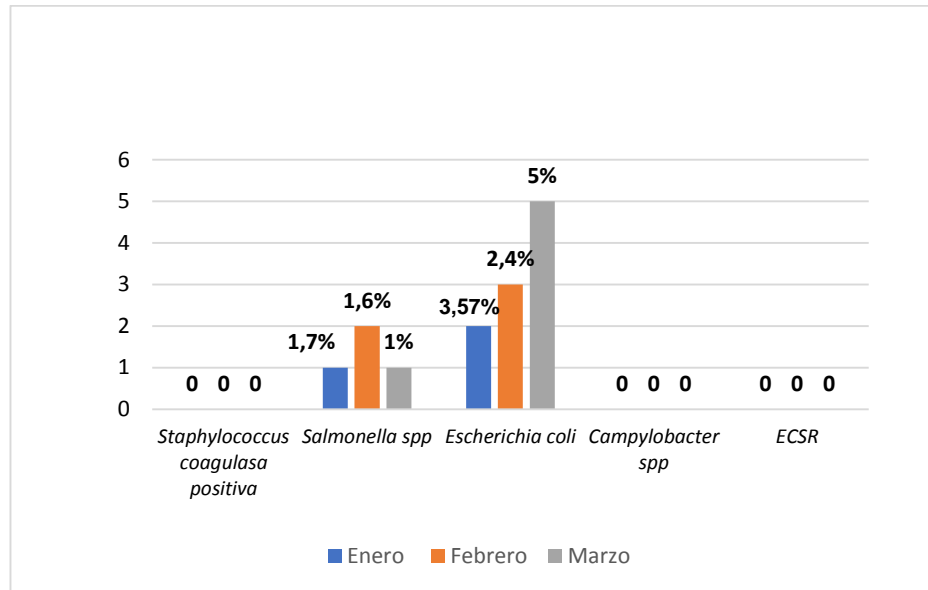
Por consiguiente, queda en evidencia la dominancia de *Campylobacter* spp. en la carne de aves, la dificultad de su eliminación total y su supervivencia debido a factores intrínsecos (estado biológico, pH, concentración de nutrientes, actividad acuosa) y extrínsecos (temperatura del chiller y prechiller, concentración inadecuada del desinfectante, manipulación incorrecta de la canal); así como la concordancia con la prevalencia de los microorganismos involucrados en las enfermedades transmitidas por alimentos, de acuerdo con el reporte anual del centro para el control y prevención de enfermedades infecciosas (CDC, 2015).

Cabe resaltar, que, con base a la normativa legal vigente, existen unos parámetros establecidos donde se relaciona el tipo de muestra, el origen, el proceso, entre otros ítems, y así, poder clasificar el producto como apto o no.

6.7.3. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados crudos.

Los productos procesados crudos hacen referencia a aquellos productos que no han sido sometidos a un proceso de cocción, fermentación o maduración. Se comercializan, almacenan y se conservan en condiciones de refrigeración o congelación. Incluyen: canales, menudencias filetes de pechuga, Nuggets, entre otros.

En la Gráfica 3, se esquematiza el periodo de producción de los meses de enero, febrero y marzo de las muestras analizadas (281 muestras), las cuales cumplieron en su totalidad con los recuentos de *S. aureus* coagulasa positiva, *Campylobacter* spp. y esporas de *Clostridium* sulfito reductor; para los recuentos y detección de *Salmonella* spp. y *E. coli*, se presentaron porcentajes de muestras que no cumplieron en valores de 1,7 % (1 muestras), 1,6 % (2 muestras), 1 % (1 muestra) y 3,57 % (2 muestras), 2,4 % (3 muestras), 5 % (5 muestras), respectivamente.



Gráfica 3. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados crudos.
Fuente: Autor

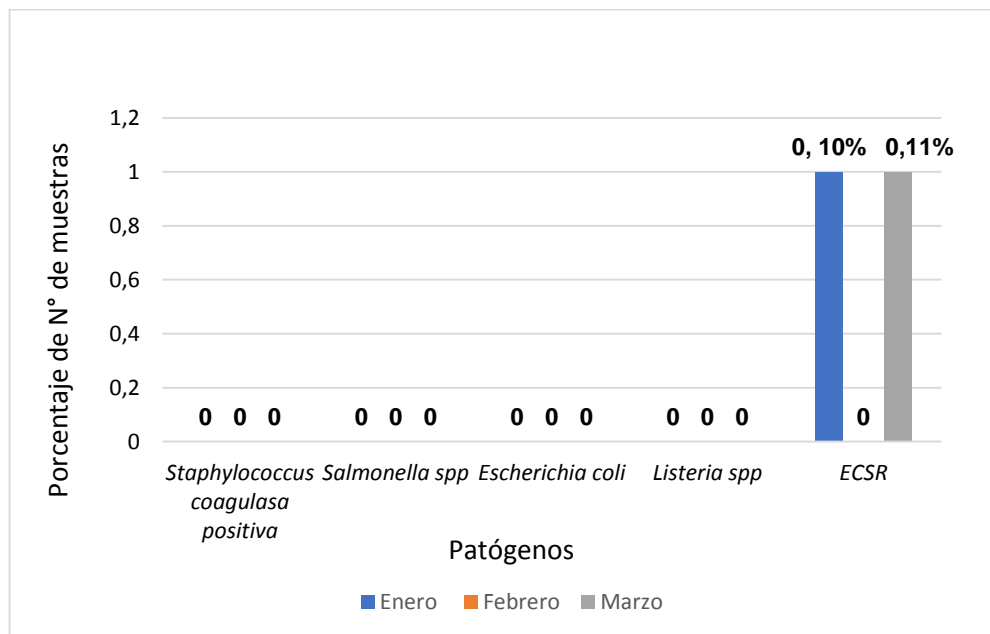
La no presencia de *S. aureus* en las muestras es un indicativo de buenos procesos de manipulación de los alimentos por parte de los operarios, que a pesar de los niveles de producción se esfuerzan día a día en realizar las actividades a su cargo bajo buenos niveles higiénicos; no obstante, la determinación de la presencia de *Salmonella spp.* y *E. coli* podría ser un indicativo de que los procesos de limpieza y desinfección tanto de las áreas como los utensilios usados no se realizan con la periodicidad y tiempos adecuados; sin embargo, existen parámetros que contienen unos valores de referencia permitidos (determinados con base al tipo de muestra, tipo de microorganismo, origen, concentraciones, entre otros) y es importante señalarlo debido a que, en este caso particular, los productos crudos para ser consumidos requieren un proceso de cocción, el cual permitirá eliminar total o parcialmente la carga microbiana. No obstante, es de suma importancia verificar la calidad de la materia prima para ser usada y tener un producto final de calidad.

6.7.4. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados cocidos.

Puesto que la empresa avícola de Santander es una unidad de negocio encaminada por la línea genética de pollo de engorde, tanto como para la producción del producto crudo como de sus derivados cárnicos precocidos, prevalece la importancia del buen funcionamiento y de trabajar bajo los

principios HACCP, pues vela por satisfacer al cliente, garantizando la calidad del producto; y así, perpetuar la gran demanda a nivel nacional.

Con relación a los resultados expuestos en la Gráfica 4, se exhibe que la prevalencia de patógenos es muy baja, concluyéndose el buen funcionamiento de las plantas, la garantía del equipamiento, la calidad del equipo humano, el análisis adecuado de los puntos críticos de control, al igual que la organización y uso eficiente de los procedimientos.



Gráfica 4. Porcentaje de número de muestras positivas de patógenos en productos procesados cocidos.

Fuente: Autor

En el transcurso de los tres meses, se practicaron análisis para un total de 926 muestras en enero, 815 en febrero y 856 en marzo, abarcando microorganismos como: 1) *Escherichia coli*, 2) *Staphylococcus coagulasa positiva*, 3) Esporas sulfito reductor, 4) *Salmonella spp.*, y 5) *Listeria monocytogenes*, donde para el análisis de *Escherichia coli* y *Staphylococcus coagulasa positiva*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, no hubo ninguna recuperación. Para las esporas sulfito reductor, los porcentajes hallados fueron de 0.10%, 0.11% en los meses de enero y marzo, respectivamente, destacando que las UFC/g recuperadas, se encontraban dentro de los valores de referencia permitidos. por ende, se puede concluir que dichos porcentajes exteriorizan que fue mínima la recuperación por lo cual las muestras analizadas en los meses anteriormente mencionadas cumplen con lo estipulado en la NTC 1325/2013 la cual establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados.

7 CONCLUSIONES

Se diseñó un instructivo para la empresa avícola de Santander y de esta manera dar cumplimiento a uno de los requerimientos de la NTC-ISO/IEC 17025:2017 en donde se describe como “requisito general para la competencia de los laboratorios de ensayo disponer de material de referencia para tener resultados confiables”, lo cual constituye un sistema que permite realizar un seguimiento del estado de los microorganismos de referencia utilizados. Además, el cumplimiento de estas condiciones permite asegurar y garantizar una validez en proyectos de investigación, en procedimientos, estandarizados, etc.

Se organizó el instructivo se establecieron las orientaciones y disposiciones generales en cuanto al manejo y conservación de las cepas de referencia, permitiendo la vigilancia en medios de cultivo, reactivos, pruebas confirmatorias, técnicas y validación de métodos.

Se realizaron actividades que determinan la calidad microbiológica de la carne de pollo y sus derivados crudos y cocidos, procesados en el laboratorio de Microbiología de una empresa avícola de Santander en los meses de enero, febrero y marzo del 2020; donde se determinó la prevalencia de microorganismos patógenos en los enjuagues de pollo, microorganismos como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., y *E. coli*.

En referencia a los análisis de los derivados cárnicos, en cuanto a los productos crudos, se observó como porcentaje máximo del 5 % de contaminación microbiana por *E. coli* y del 1.7 % por *Salmonella* spp., en enero y marzo, respectivamente; correlacionándose estos resultados como fuera de la normativa “NTC 1325:2013”, clasificando estos productos como no aptos para el consumo humano, dándose de baja a los mismos.

Además, en los resultados arrojados en el análisis de productos cárnicos cocidos se observa la presencia de Esporas *Clostridium* sulfito reductor donde la recuperación de este microorganismo fue mínima (una muestra) y en lo que se estipula en la normativa se encuentra entre el número de muestras permitidas con resultados entre el índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad (m) e índice máximo para identificar nivel aceptable de calidad (M).

Por consiguiente, se determina que todas las actividades ejecutadas en el laboratorio de la empresa Avícola de Santander se fundamentan bajo los estándares de calidad con la finalidad de garantizar la inocuidad de sus productos y de esta manera, satisfacer las necesidades de los consumidores.

8 RECOMENDACIONES

Con el fin de asegurar la calidad de los medios de cultivo y reactivos, se recomienda mediante el uso de cepas de referencia, realizar pruebas de promoción del crecimiento y selectividad por lote de producción.

Se deben establecer periodos de tiempo más largos para la conservación de las cepas de referencia dado que la revisión bibliográfica muestra estudios de conservación hasta de tres años.

Se debe tener una buena manipulación y esterilidad mediante el cumplimiento de los protocolos de bioseguridad y de los procesos operativos estandarizados en el laboratorio, garantizando el correcto funcionamiento de los equipos necesarios para esta clase de estudio como lo son: espectrofotómetro, cámara de flujo laminar, incubadora, congelador, nevera, mechero y agitador.

Se recomienda en planta de beneficio, aumentar tiempo de desinfección y almacenamiento en congelación para las carcasas de pollo sin incumplir lo que estipula la normativa.

En cuanto a los productos derivados cárnicos procesados crudos y cocidos se recomienda realizar un proceso de cocción a todos los productos por parte del consumidor; además se recomienda que una vez abierto el empaque, se debe transferir y almacenar a uno nuevo y limpio.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfonso, M., Gonzales, 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.

Allievi, L., and Salardi, C. 1993. Frozen storage (-20°C and -80°C) of soybean *Bradyrhizobium* cell suspension. *Microb.* 16: 196-08.

Arakawa, T., Carpenter, J.F., Kita, Y.A., Crowe, J.H. 1990. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Criobiology.* 27: 401-415.

Arencibia, D.F., Rosario, L.A., Gámez, R. 2008. *Métodos Generales de Conservación de Microorganismos*. Ediciones Liorad. Recuperado el 26 de marzo del 2020, de: https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos

Berneio, P., Flórez, D., Ocampo, M., 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 (Colombia)*.

Castañeda., A. 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. (Trabajo de grado) Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá D.C.

Castro, G., Hernández, J.T., Aquino, C. 2000. *Manual sobre conservación de microorganismos*. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Centers for Disease Control and prevention (CDC). *Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Foodnet): FoodNet 2015*.

Ciba. 1977. The freezing of mammalian embryos. *Ciba Found. Symp.* 52. Excerpta Medica, North-Holland, Amsterdam. p.330.

Cody, W.L., Wilson, J.W., Hendrixson, D.R., McIver, K.S., Hagman, K.E., Ott, C.M., Nickerson, C.A., Schurr, M.J. 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 degrees °C bacterial stocks. USA. Department of Microbiology, University of Colorado Denver, School of Medicine, Aurora, CO 80045, USA. *J MicrobiolMethods*; 75(1):135-8. doi:10.1016/j.mimet.2008.05.006. Recuperado el 25 de marzo de 2020, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573555>.

Crist, D.K., Wyza, R.E., Mills, K.K., Bauer, W.D. 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:895-900.

Cooper, V.S. 2002. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. Quantifying the fundamental and realized niche. *BMCEvol. Biol.* 2: 12.

Date, R.A. and Halliday, J. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of Rhizobia. *Technology*. New York, P.413-428.

Decreto 1500 de 2007 | Instituto Distrital de Protección y Bienestar Animal. (2007). Tomado de <http://www.proteccionanimalbogota.gov.co/transparencia/marcolegal/normatividad/decreto-1500-2007> [Citado el 20 de Agosto 2020]

Decreto Numero 60 DE 2002. (2002). Tomado de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Decreto0060-de-2002.pdf> [Citado el 22 Agosto 2020]

Devay, J.E. and W.C. 1963. Schanosthorst. Single cell isolation and preservation of bacterial cultures. *Nature*. 199: 775-777.

Durães, L., Pagnocca, F.C. & Rodrigues, A. 2013. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 2-8. doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.004

Duque, E., Molina-Henare, A.J., De la Torre, J., Molina-Henares, M.A., Del Castillo, T., Lam, J. & Ramos, J.L. 2007. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas*. Ramos JL & Filloux A (eds). Netherlands, Springer. pp. 227-51.

Facco, R., Harumi, E., Thie, B., Ludwig, A., Leadir, L., Olivier, A., Venturini, M. 2019. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International* Volume 115, Pages 90-94. Recuperado el 25 de marzo de 2020, de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918305817?via%3Dihub>

Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*. 23: 1-13.

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., 1987. Meryman, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 2 1: 407-426.

García, E. 2013. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores de Zaragoza. Recuperado el 29 de Marzo de 2020. Disponible en: https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_garcia_lopez.pdf.

García, M.D. and Uruburu, F. 2000. Conservación de cepas microbianas. SEM 30: 12-16, celular.

García, L., Scherer, C., Rodríguez, R. 1991. Supercooled liquids and glasses. Scienceforall digital library. Physics. Economic Culture. México.

González, R.A., De Oca Martínez, N.M., Riveron, Y. & Núñez, A. 2006. Aseguramiento de la calidad en las colecciones de cultivos microbianos (monografía). Dirección de Calidad. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), La Habana, Cuba.

Grauer, A., Grunberg, K., Zardo, S. 2015. Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos. (Tesispregrado) Universidad ORt Uruguay. Uruguay.

Hawksworth, D.L., Sastramihardja, I., Kokke, R., Stevenson, R. 1999. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. World Federation of Culture Collection Standard Committee. UK: Simwoth Press. 24.

Hubalek, Z. 2003. Review. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*. 46: pp. 205-229.

Huertas, S., Pérez, M., Berna, Z. y 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 Bogotá, Colombia (IBUN).

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo. NTC - ISO 11133:2014 Bogotá D.C. El Instituto. 2014.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo de calibración. NTC - ISO 17025 del 2017. Bogotá D.C. El Instituto. 2017.

Ivshina, I.B. & Kuyukina, M.S. 2013. Turning Russian specialized microbial culture collections into resource centers for biotechnology. *Trends in*

Biotechnology, 31(11), 609-611. doi:10.1016/j.tibtech.2013.08.002

James, E.R. 1984. Maintenance of parasitic protozoa by cryopreservation. A manual of laboratory methods. Academic press. London. P.161-176.

Jennie, C., Hunter, A.B. 1996. Maintaining cultures for biotechnology and Industry San Diego, California: Academic Press.

Jong, S., Atkins, W.B. 1985. Conservation, collection and distribution of cultures. Marcel Dekker. New York, 153-194.

Kumar, S., Kashyap, P.L., Singh, R., & Srivastava, A.K. 2013. Preservation and maintenance of microbial cultures. In *Analyzing Microbes* (pp. 135-152). Springer, Berlin, Heidelberg.

Manzanera, M., Vilchez, S. and Tunnacliffe, A. 2002. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectone. FEMS Microbiol. Lett. 233: 347.

Mazur, P. 1970. The freezing of biological systems. Science N.Y. Cryobiology. 168, 939-949.

Meryman, H.T. 1966. Cryobiology. Academic Press, London and New York. Pp. 1-114.

Ministerio De Salud Y Protección Social; (2012) DECRETO 2270 DE 2012, Diario Oficial No. 48.606 de 6 de noviembre de 2012.

Ministerio De Salud Y Protección Social, Resolución Número 4287 DE 2007 (21 de noviembre).

Ministerio De Salud Y Protección Social, (2013) Resolución 242 DE 2013 (enero 31) Diario Oficial No. 48.699 de 9 de febrero.

Ministerio De Salud Y Protección Social, (2013) Resolución 241 DE 2013 (enero 31) Diario Oficial No. 48.699 de 9 de febrero.

Montes de Oca, N., González, R.A., Riveron, Y., Nuñez, A., Villoch, A., Rodríguez, N. 2008. Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. Rev. Salud Anim. Vol. 30 No. 1: 17-24.

Morales, Y., Duque, E., Rodríguez, O., De la Torre, J., Martínez, R., Pérez, R., Muñoz, J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Rev. Biotecnología Vol 14.

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A. & Ramos, J.L. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. Appl. Environ. Microbiol. 72: 472-477.

Naranjo, J., Ortiz, S., Bueno, L. 2018. Estandarización de un método para la conservación de cepas de laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira. Universidad tecnológica de Pereira.

Norma Técnica Colombiana, (2018), NTC 3644-2, industrias alimentarias. Pollo beneficiado.

Norma Técnica Colombiana, (2018) NTC 4458, microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.

Norma Técnica Colombiana, (2015) NTC 6127-1, microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Campylobacter* spp. Parte 1: método de detección.

Norma Técnica Colombiana, (2007) NTC 4779, Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* Y otras especies).

Norma Técnica Colombiana, (2007) NTC 4574 microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

Guía Técnica Colombiana, (2007) GTC 155 guía para la evaluación y prevención de microorganismos en plantas de alimentos: *Listeria monocytogenes*.

Olalde, P.V. & Aguilera, G.L.I. 1998. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra Latinoamericana*, 16(3), 289-292.

Pacheco, J., Serpas, R., 2013. Evaluación de dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos. (Tesis de pregrado) Universidad de El Salvador, Facultad de Química y farmacia. San Salvador, El Salvador, Centroamérica.

Palmfeldt, J., Radström, P., and Hahn-Hägerdal, B. 2003. Optimization of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*. 47: 21-29.

Pedroza, A., Quevedo-Hidalgo, B. y Matiz, A. 2007. Manual de laboratorio de procesos biotecnológicos. Primera edición. Colección de apuntes, Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. ISBN: 978-958-716-029-1.

Perry, S.F. 1995. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Methods Mol. Biol.* 38: 21-30.

Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58: 755-805.

Smith, D., Green, P., Day J. 2000. Management and maintenance of culture collections. La Habana: Instituto de Sueros y Vacunas Finlay: 22.

Sharma, S.K, Varma, A. 2018. Microbial Resource Conservation. Chapter 1 (pp. 1 – 32) Springer International Publishing.

Soto, L.P. 2010. Elección de un método de conservación que asegure la viabilidad de bacterias indígenas prebióticas y mejore la efectividad de administración a terneros lactantes criados a campo. Departamento de Salud Pública. Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias.

Stanbury, P., Whitaker, A. 1987. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, New York.p.17-53.

Stromberg, P.M., Dedeurwaerdere, T. & Pascual, U. 2013. The heterogeneity of public ex situ collections of microorganisms: Empirical evidence about conservation practices, industry spillovers and public goods. *Environmental Science and Policy*, 33, 19-27. doi: 10.1016/j.envsci.2013.04.003

ThermoScientific (En línea). Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Culti-Loops-Brochure-ES.pdf>

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K.& Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic microbial. *Revs.* 60:407-438.

World Federation for Culture Collections.WFCC. 2010. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos (Terragno, R., Martos, Gladys, I., Suárez, A., Roberto, Davel, G., trad.). Argentina: Asociación Argentina de Microbiología. (Obra original publicada en 2010). Recuperadode http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf

World Federation for Culture Collections. WFCC.2012. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" [en línea] [Actualización 2012; Consulta 29 de Marzo de 2020]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.

Zuberer, D.A. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of associative N₂-fixing bacteria. New York. P.95-122.

10 ANEXOS

Anexo 1. Formato Verificación de esterilidad, promoción de crecimiento y selectividad de los medios de cultivo mediante el uso de cepas ATCC.

Verificación de Esterilidad Promoción de Crecimiento y Selectividad de los Medios de Cultivo Mediante el Uso de Cepas ATCC												Codigo		Version:			
Fecha	Identificación del medio				Esterilidad del medio		Promoción del crecimiento					Selectividad			Resultado	Verifico	Observaciones
	Medio de cultivo	Lote	Certificado del medio	T° de incubación	Conforme	No conforme	UFC inoculadas	Log 10	UFC Recuperadas	Log 10	Productividad	Microorganismo	Crecimiento del microorganismo				
													Parcialmente	Completamente			



Anexo 2. Montaje Microbiología de alimentos.



Anexo 3. Montaje de aguas por Número más probable.



Anexo 4. Montaje aguas mediante filtración por membrana.



Anexo 5. Montaje de muestras de limpieza y desinfección.



Anexo 2. Lectura Microbiología alimentos.