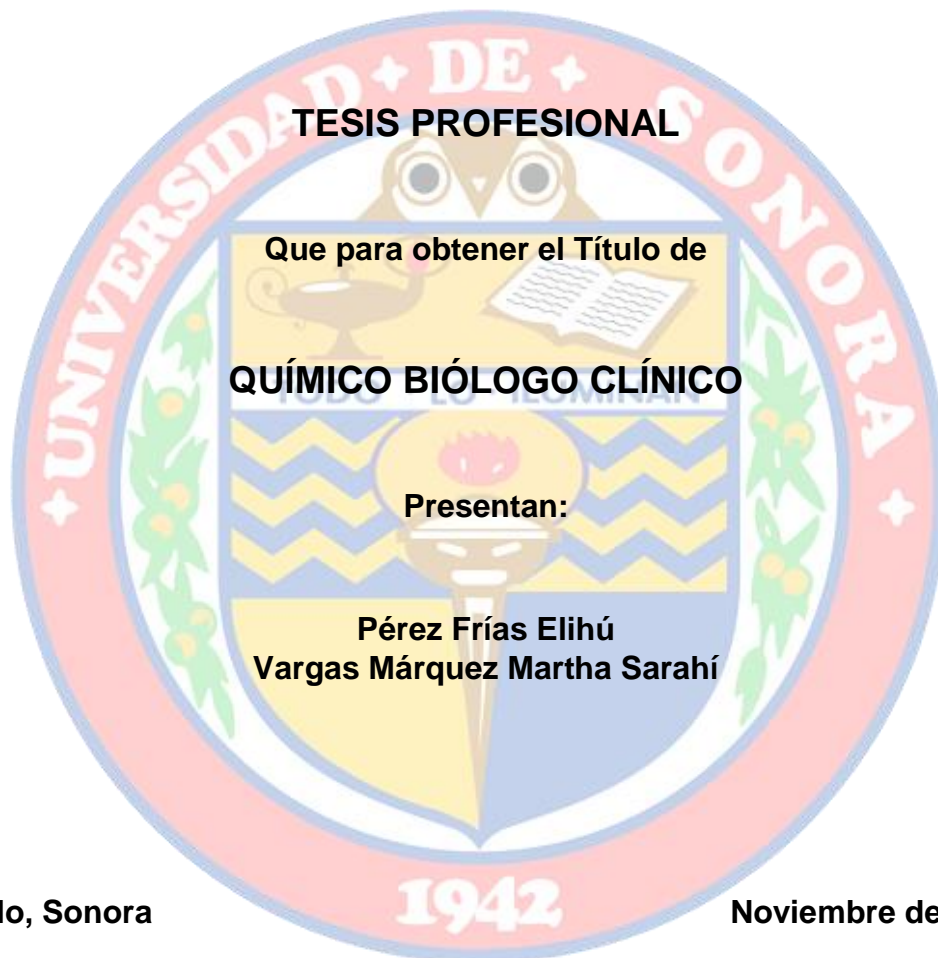


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Preservación de *Streptococcus pyogenes* mediante liofilización  
utilizando leche descremada al 1% como agente crioprotector”



Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Elihú Pérez Frías y Martha Sarahí Vargas Márquez, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

---

M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra  
Presidente

---

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña  
Secretario

---

M.C. Iracema del Carmen Rodríguez Hernández  
Vocal

---

Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño  
Suplente







## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABLAS .....	10
OBJETIVOS.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivo Particulares.....	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
ANTECEDENTES.....	17
Importancia de la Conservación Bacteriana.....	17
Métodos de Conservación Bacteriana.....	18
Preservación a Corto Plazo.....	19
Preservación a Mediano Plazo.....	21
Preservación a Largo Plazo.....	22
Congelación.....	23
Crioprotectores.....	24
Liofilización.....	27
Equipo de Liofilización.....	30
Etapas del Proceso de Liofilización .....	32
Ventajas y Desventajas de la Liofilización.....	40
Preservación de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
Cepas.....	44

Criterios de Inclusión.....	44
Criterios de Exclusión.....	44
Equipo.....	44
Obtención y Caracterización de Cultivos Axénicos de Cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	45
Suspensión Bacteriana Inicial.....	45
Congelación.....	45
Cuantificación de Bacterias Viables.....	46
Siembra por Extensión en Placa para la Determinación de Pureza Pre	
Liofilización.....	46
Liofilización.....	47
Cuantificación de Bacterias Viables Post Liofilización.....	47
Siembra por Extensión en Placa para la Determinación de Pureza Post	
Liofilización.....	47
Control de Calidad.....	48
Análisis Estadístico.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
Obtención y Caracterización de Cultivos Axénicos de Cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	49
Obtención de Suspensión Bacteriana para Inóculo Inicial.....	49
Cuantificación de Bacterias Viables Post Liofilización.....	50
Efecto de la Leche Descremada como Agente Crioprotector.....	51
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56



BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Liofilizador de laboratorio.....	28
2 Esquema general de un sistema de liofilización.....	31
3 Pasos del proceso de liofilización .....	32
4 Diagrama de fases del agua y sistemas de secado .....	33
5 Transferencia de calor y masa en el secado por congelación.....	34
6 Modelo para el frente de hielo en retroceso en el secado por congelación.....	35
7 Etapas del proceso de liofilización .....	39
8 Porcentaje de viabilidad de la cepa 99.....	52
9 Porcentaje de viabilidad de la cepa 100.....	53
10 Porcentaje de viabilidad de la cepa 10.....	53
11 Porcentaje de viabilidad de la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.....	54
12 Comparación de las cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> respecto a la cepa control.....	54

## LISTA DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
1 Cuenta pre liofilización promedio de cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	50
2 Cuenta post liofilización promedio de cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	51

## **OBJETIVOS**

### **General**

Preservar cepas de *Streptococcus pyogenes* mediante liofilización utilizando leche descremada al 1% como agente crioprotector.

### **Particulares**

1. Determinar la pureza de las cepas de *Streptococcus pyogenes*.
2. Congelar las cepas aisladas de *Streptococcus pyogenes* a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando leche descremada al 1%.
3. Liofilizar las muestras que fueron sometidas previamente a congelación.
4. Realizar el recuento bacteriano antes y después de llevar a cabo la liofilización.
5. Realizar el análisis estadístico por métodos no paramétricos.

## RESUMEN

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado a bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad. El agente protector empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10% al 20%, ya que evita la lesión celular mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular y crea una estructura porosa en el producto liofilizado que hace más fácil la rehidratación, además de contener proteínas que proporcionan una capa protectora para las células. En este trabajo se liofilizaron cepas de *S. pyogenes* obtenidas de aislamientos clínicos del Hospital Dr. Ignacio Chávez, como método de conservación a largo plazo. Se tomaron 250µL de células bacterianas cultivadas, suspendidas homogéneamente en un medio general adicionado con 1% de leche descremada. Se refrigeraron a 4°C durante 30 minutos, y se congelaron a -80°C de 24-48 horas, para después llevar a cabo el proceso de liofilización por 24 horas, a una presión de al menos 0.250mBar y a una temperatura de -53°C. Los viales que contenían el liofilo se sellaron con parafilm y fueron almacenados a temperatura ambiente. Para determinar la viabilidad post liofilización, se añadió 1mL de agua peptonada estéril al vial que contenía la muestra liofilizada y se homogeneizó. Se realizó la técnica de cuenta de bacterias por placa vaciada de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Las características propias de las cepas estudiadas se mantuvieron estables y sin contaminación evidente. Las cepas en leche descremada al 1%, conservaron la viabilidad de 10<sup>6</sup>UFC/mL, demostrando así que dicha concentración del agente crioprotector en la liofilización fue efectiva para la conservación, siendo un método de gran utilidad en el trabajo de las colecciones de cultivos que se emplean en el laboratorio de microbiología.

## INTRODUCCIÓN

El estreptococo beta hemolítico del grupo A es un patógeno bacteriano de importancia clínica principalmente por sus secuelas no supurativas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda post-estreptocócica. Es la causa bacteriana más frecuente de faringitis aguda, además de ser responsable de una diversidad de infecciones cutáneas y sistémicas como fascitis necrosante y choque séptico. A partir de la década de los ochenta ha habido un incremento importante tanto en la frecuencia como en la gravedad de las formas clínicas conocidas, así como el número de casos de enfermedad reumática a nivel mundial (Rivera, 1998).

Es un organismo de vida libre, sin embargo, su nicho ecológico parece ser bastante estrecho: su único "huésped biológico" conocido es el ser humano, y como muchos otros estreptococos, carece de un reservorio ambiental de importancia conocida. De este modo, su transmisión es directamente de persona a persona, que se produce principalmente a través de gotitas respiratorias o por contacto de la piel (Osterlund y col., 1997; Cleary y col., 1998).

Generalmente la única manera fácil de preservación es la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  aunque en la mayoría de los laboratorios no hay equipos capaces de alcanzar esta temperatura; y a corto plazo utilizando agar base sangre en pico de flauta a temperatura de refrigeración, lo cual requiere de constantes resiembras para mantener su pureza y viabilidad.

El mayor problema de estos métodos son las resiembras, ya que constituyen una posibilidad de cambio en su comportamiento genético, y por lo tanto, si bien estos microorganismos conservan sus características por un tiempo, no se tendría la certeza que la bacteria haya sufrido cambios transitorios o permanentes. Esta observación llevó a valorar otros métodos de conservación que sean más reproducibles y confiables, con el fin de garantizar la calidad del microorganismo conservado en un tiempo considerable (Pierre y col., 1996; Valencia, 2009).

Entre los métodos conservación se encuentra la liofilización, debido a que previene el daño térmico, los volátiles diferentes al agua son retenidos, el producto se reconstituye y el encogimiento es despreciable. Ofrece ventajas tan importantes como la preservación y fácil transporte de los productos, la ausencia de temperaturas altas, la inhibición del crecimiento de

microorganismos contaminantes, o la recuperación de las propiedades con su rehidratación, además que los productos liofilizados y adecuadamente empacados pueden ser guardados por largos períodos de tiempo, ya que en buena medida retienen las propiedades físicas, químicas y biológicas (Pardo, 2002).

En el proceso de liofilización, en general, se produce una variedad de estrés por congelación y secado, tales como la concentración de soluto, la formación de cristales de hielo, cambios de pH, etc. Todas estas tensiones pueden provocar la desestabilización del material biológico procesado en diversos grados. Por lo tanto deben añadirse estabilizadores especiales para proteger estos sistemas frágiles del estrés por congelación (crioprotector) o estrés por secado, y también para aumentar su estabilidad durante el almacenamiento (Wang W., 2000; Abdelwahed y col., 2006).

Existen sustancias que se utilizan comúnmente con buenos resultados como protectores en la liofilización de bacterias. Estos compuestos son la leche descremada, las peptonas, el glutamato de sodio, los azúcares y otros, éstos agentes protegen no sólo la viabilidad sino también las propiedades funcionales de las bacterias (Praveen y col., 2009).

Entre las sustancias anteriores, se selecciona la leche descremada en polvo como medio de secado ya que es capaz de evitar la lesión celular mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular, crea una estructura porosa en el producto liofilizado que facilita la rehidratación y contiene proteínas que proporcionan una capa protectora para las células (Carvalho y col., 2004).

Hasta ahora, varios mecanismos mostraron ser responsables del efecto protector ejercido por la leche descremada en la supervivencia de los microorganismos durante la liofilización. King mostró que las proteínas de leche pueden formar una capa protectora en las proteínas de la pared celular y el calcio presente en la leche aumenta la tasa de supervivencia después de la congelación o la liofilización al estabilizar las enzimas celulares. Sin embargo, Castro y colaboradores, sugirieron que se esperaba que los sólidos de leche descremada se utilizaran para evitar lesiones celulares mediante la estabilización de los componentes de la membrana celular (Barach y col., 1976; Castro y col., 1995; Baokun y col., 2011).

La leche descremada (sólidos de leche sin grasa) en una concentración de 1%-10% a menudo se ha utilizado para la criopreservación, pero incluso con más frecuencia en la liofilización de muchos microorganismos, a veces en combinación con otras sustancias. Keith describió el efecto crioprotector de leche en *Escherichia coli* cuando se congela a -20°C. Por otro lado *Mycobacterium tuberculosis* suspendida en leche se mantuvo 100% viable durante al menos un año después del almacenamiento a -70°C. También se utilizó para la criopreservación de *Leptospira interrogans*, micoplasmas, *Pasteurella multocida* y bacterias ácido-lácticas (Hubálek, 2003; Borrego y col., 2011).

Por lo antes mencionado, *Streptococcus pyogenes* es objeto de estudio en el programa de prácticas de microbiología de algunas licenciaturas que forman parte de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora (como lo son Químico Biólogo Clínico, Enfermería, Medicina, Nutrición y Odontología), misma que cuenta con un cepario que proporciona los cultivos bacterianos en primer término para el desarrollo de prácticas de laboratorio del área de microbiología; que desde hace muchos años posee una diversidad de microorganismos, los cuales han sido conservados a corto y mediano plazo por métodos convencionales, como lo son las resiembras periódicas y congelación a -20°C.

En el caso de microorganismos bacterianos de difícil recuperación, como es el caso de *Streptococcus pyogenes*, que nutricionalmente es exigente ya que requiere de medios complejos enriquecidos con sangre para su desarrollo óptimo y no es fácil de conservar, las técnicas empleadas en el cepario de la universidad no han sido efectivas, originando la pérdida de la bacteria al poco tiempo y por ende, su imposible utilización en los programas de docencia dentro de los laboratorios de microbiología; lo cual repercute en el conocimiento del alumnado para la correcta identificación de sus características macro y microscópicas, así como sus propiedades bioquímicas.

Debido a esta problemática se han intentado implementar otros métodos más confiables y reproducibles que permitan la conservación a largo plazo de estos microorganismos de difícil mantenimiento, conservando sus características y reduciendo al mínimo su posible contaminación, como la liofilización.

En un estudio previo realizado por Duarte y Mancera, se evaluaron tres crioprotectores (DMSO, glicerol y leche descremada), en diferentes concentraciones, no encontrando



diferencias significativas entre ellas, y aunque no significativo si se obtuvieron mejores resultados al utilizar leche descremada en concentración de 1%, por lo que el objetivo principal de este trabajo es emplear la técnica de liofilización para la conservación de *Streptococcus pyogenes*, el cual no ha sido posible su conservación por métodos convencionales (Duarte y Mancera, 2011).

## ANTECEDENTES

### Importancia de la Conservación Bacteriana

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. 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. Por ejemplo, algunas bacterias promueven el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, entre los que se incluyen la fijación biológica de nitrógeno, el aumento de disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, la influencia positiva en la morfología y tamaño de las raíces de la planta, el control biológico y la potenciación de otras simbiosis benéficas planta-microorganismo (Battistuzzi, 2004; Cárdenas y Tiedje, 2008; Lugtemberg y Kamilova, 2009).

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. Debido a las características tan versátiles de metabolismo que presentan las bacterias, los investigadores han estado muy interesados en aislar nuevas especies bacterianas y descubrir otras características potenciales para el ser humano que puedan ser aplicadas para el beneficio humano (Broadbent y col., 2003; Pauly y col., 2005; García *et al.*, 2007).

Para estudiar y explotar esas potencialidades, es conveniente resguardar las bacterias en bancos, conservando sus características y viabilidad. El problema de trabajar con microorganismos es que su tiempo de vida generalmente es corto, por lo que son necesarias generaciones sucesivas del organismo, que conserven características idénticas entre sí, lo que puede presentar una serie de problemas (Uruburu, 2003).

Existen en el mundo un gran número de colecciones depositarias de cultivos que se dedican al mantenimiento de los microorganismos (ofrecen la garantía de sus características). Muchas de estas colecciones son reconocidas internacionalmente; por medio de ellas, se puede adquirir la mayoría de los microorganismos existentes. Entre la diversidad de colecciones se

destacan: "American Type Culture Collection", USA, la cual mantiene bacterias, levaduras, algas, actinomicetes, mohos, protozoos, virus y líneas celulares; "Colletion Nationale de Cultures de Microorganismes" del Institut Pasteur, Francia; "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), de Peoria, USA, y "National Collection of Type Cultures", Londres, Inglaterra. Cuando se adquiere un microorganismo de una colección, viene identificado con las abreviaturas de la colección de la que proviene; por ejemplo, el microorganismo *Phanerochaete chrysosporium* CDBB H.28 pertenece a la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México (Hernández, 2003).

El potencial uso de los microorganismos obliga cada vez más a promover actividades de aseguramiento de la calidad para su conservación, de manera que puedan ser utilizados en diversos ensayos analíticos en los laboratorios de control microbiológico. La necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad impuso la introducción de métodos de conservación de microorganismos que reducen al mínimo la posibilidad de contaminación y garantizan al menos la supervivencia del 70 % de las células por un período determinado de tiempo (Burguet-Lago y col., 2012).

### **Métodos de Conservación Bacteriana**

La preservación exitosa de las cepas es de gran importancia en la colección de cultivos y requiere estar familiarizada con las técnicas modernas que causen el mínimo daño a las células, aseguren su máxima viabilidad y autenticidad, estabilizando el comportamiento genotípico (Safronova y col., 1996).

En todo trabajo de microbiología se deben conocer las características de la población con la cual se va a trabajar (tanto propiedades morfológicas como bioquímicas). En este sentido, tanto en la preservación como en el desarrollo del cultivo, ya sea el que suministra o el que recibe la cepa, deberían idealmente usar las mismas técnicas metodológicas. Tanto para el mantenimiento, preparación y reproducción de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no generen variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada (Ertola y col., 1994).

Los objetivos de la preservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- a) Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- b) Preservar los niveles de su productividad inicial.
- c) Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad (Ertola y col., 1994).

Existen métodos de preservación variados para los distintos microorganismos y es importante mencionar que ninguno de ellos es universal, por lo que se debe de elegir el método que más se ajuste a los recursos técnicos que se dispongan, la infraestructura del laboratorio y al microorganismo que se desea preservar. La selección del método va a depender de varios factores, entre los cuales destacan los siguientes:

- La susceptibilidad del microorganismo (referente al proceso de preservación).
- La facilidad con la cual podrían surgir cambios genéticos en la cepa.
- El número de muestras que se necesite conservar.
- El costo del proceso de preservación.
- Tiempo estimado durante el cual se conservará el microorganismo.
- Equipo disponible.
- Posible contaminación durante el proceso (Hernández, 2003).

### **Preservación a Corto Plazo**

Esta forma de resguardo se utiliza cuando los laboratorios no tienen un potencial económico suficiente, por ejemplo, no hay un ultracongelador. El método comúnmente usado es la resiembra continua. El microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se almacena a 4°C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a sembrar en un tiempo no mayor a un mes. El gran problema de la resiembra continua de un microorganismo, es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas “domesticadas” cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada (Cooper, 2002).

Existen otros métodos de preservación alternativos bastante utilizados para diversos tipos de microorganismos como los hongos filamentosos, las levaduras y algunas bacterias. Un método consiste en suspender a los microorganismos en agua destilada estéril o agua de mar estéril (en el caso de microorganismos marinos) (García y Uruburu, 2000).

Por otro lado, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas campestris*, *Cytophaga johsonae*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* han sido preservadas en agua y en solución de fosfatos salina, observando que sobreviven en números elevados en la segunda condición respecto a agua sola. En agua algunas bacterias podrían morir y liberar sus componentes, que a su vez, podrían ser usados por otras bacterias para su crecimiento consecutivo. Por esta razón, en cada caso será importante evaluar la tasa de mutación que los microorganismos podrían sufrir bajo esta condición de resguardo. Para evitar la domesticación y mutación de bacterias (durante su resguardo), se ha intentado inactivar su metabolismo, mediante técnicas de resguardo conocidas como “métodos restringidos” (Liao y Shollenberger, 2003).

Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible de la célula; donde se permite la desecación de bacterias en un soporte inerte y estéril. En este caso las bacterias se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gruesa. Es importante destacar que la desecación en bolitas de alginato es un procedimiento bastante eficaz para preservar bacterias; donde las células son conservadas en tubos estériles, cerrados herméticamente y a una temperatura de entre 4°C y 18°C (Pravakaran y Hoti, 2008).

La desecación en sal gruesa, es un método usado para halobacterias; en el cual, las células se mezclan con una solución de sal gruesa y se secan aprovechando la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por el nivel insuficiente de agua disponible en el medio. En éste, las bacterias pueden contener un poco de sustrato e incluso humedad, no obstante el tiempo en que las bacterias se mantienen es un período corto que a lo mucho abarca 6 meses (Bashan, 1998; García y Uruburu, 2000).

En varios de los métodos de preservación a corto plazo el riesgo de contaminación es alto debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales normales.

En el caso específico de 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 (Potts, 1994).

### **Preservación a Mediano Plazo**

Este es un método que requiere un laboratorio con congeladores que conserven las células de -5°C a -20°C; en este intervalo, los microorganismos permanecen viables (es decir, una vez descongelados, los microorganismos conservan todas sus funciones y características) por uno o dos años. El método no se recomienda para periodos de almacenamiento mayores. El método conocido como “congelación ordinaria” ha resultado muy fácil de desarrollar y muchos laboratorios en el mundo lo han elegido por su fácil manejo. Para preservar microorganismos por congelación, 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. Esa sustancia es conocida con el nombre de “crioprotector”, los cuales ya se han explorado y desafortunadamente no existe un crioprotector universal. Hay pocos trabajos que exploren el uso adecuado de un crioprotector para una especie bacteriana en específico, no obstante, se tienen numerosos datos gracias a la experiencia de diversos laboratorios, que en conjunto han generado un gran conocimiento acerca de la forma efectiva para preservar un microorganismo y del tipo de crioprotector que se debe utilizar (Perry, 1995; Hubálek, 2003).

Si recordamos que desconocemos a la mayoría de especies bacterianas que habitan en un ambiente, podemos inferir que se conoce poco referente a las formas para preservar microorganismos por congelación. Solo por mencionar un dato relevante, aun cuando muchos laboratorios usan glicerol (25%-35%) para preservar a sus microorganismos por congelación, el crioprotector con más datos de efectividad reportada para un gran número de especies es el dimetil sulfóxido. De hecho, algunas veces se fracasa en preservar a un microorganismo por congelación. Esto podría ser debido a que las bacterias mueren si no se usa el protector adecuado. Sin estos compuestos podrían formarse agujas de agua y también se genera un

estrés osmótico debido a la baja disponibilidad de agua que ocurre durante el proceso de congelación (Perry, 1995).

Además de la infraestructura, el método por congelación, requiere de un gasto energético alto y constante para mantener las temperaturas tan bajas que son deseadas. No obstante, la ventaja más grande de este método es que es muy rápido y fácil de llevar a cabo. Se especula que las células bacterianas podrían mutar durante el proceso de congelación, por ejemplo, algunos microbiólogos aseguran que las cepas resguardadas por congelación, pierden algunas características importantes; como la capacidad de fijar nitrógeno. El fenómeno de mutación ha sido reportado solamente en algunos trabajos, como ocurre para *Saccharomyces cerevisiae* cuando se congela lentamente (Stoycheva y col., 2007).

### **Preservación a Largo Plazo**

Clasifican en la primera de estas categorías la congelación (a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y la liofilización como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos (cultivos de hongos, bacterias y levaduras, algas, suero, células sanguíneas, entre otros) y que sean reconocidas como técnicas de elección. El elevado costo de los equipos que emplean estos métodos dificulta su implementación en muchas instituciones, las que en ocasiones hacen uso del servicio de mantenimiento y conservación mediante estos, los cuales brindan colecciones de cultivos reconocidas (Weng y col., 2005).

Debe de tomarse en consideración que para incrementar la supervivencia de las células que se resguardan bajo condiciones de liofilización, se ha implementado el uso de sustancias que actúan como protectoras (lioprotectores) y se tiene que explorar la sustancia que protege a la bacteria que se desea conservar (Muñoz-Rojas y col., 2006).

## Congelación

Cuando hay necesidad de almacenar por un período largo, es necesario reducir la actividad metabólica de células microbianas hasta un punto en que se detiene la reproducción. La actividad bioquímica de las células puede ser reducida a un estado de “actividad suspendida”, disminuyendo la temperatura hasta la máxima eliminación del agua. Las células deben ser criopreservadas cuando la fase exponencial de crecimiento aumenta y las oportunidades de recuperación sean buenas (Prescott, 1982; Medealy, 2006).

Los métodos pueden ser ampliamente clasificados acorde a la temperatura de almacenamiento, las temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  son logrados por congeladores estándar en laboratorios, a  $-70^{\circ}\text{C}$  con ultra-baja temperatura de congelación y de  $-140^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  con nitrógeno líquido. La viabilidad celular es casi independiente del periodo de almacenamiento, y se cree que los sistemas biológicos son genéticamente estables (Jhon G, 1995).

Muchos laboratorios almacenan bacterias por congelación en nitrógeno líquido y utilizan agentes crioprotectores como glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Los microorganismos pueden ser preservados desde  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 a 2 años en congelación en caldos de cultivos o suspensión celular (Grainger, 1984; Demain, 1999).

La razón científica de usar temperaturas extremadamente bajas es que por debajo de  $-139^{\circ}\text{C}$  para el agua y debajo de  $-130^{\circ}\text{C}$  para los medios de cultivo, las moléculas no se mueven, no hay reacciones químicas y se reduce el daño celular, ocurrido durante los procedimientos de congelación. De hecho, una de las desventajas consiste en el daño severo de las células expuestas a congelación, ocasionadas por la formación de hielo intracelular, en otras desventajas de la criopreservación son los altos costos del equipo y de los reactivos, y en el caso de nitrógeno líquido, la necesidad de un suministro constante, cualquier interrupción en el flujo del nitrógeno puede llevar a la pérdida de las muestras guardadas (De Paoli, 2005).



## Crioprotectores

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación. Para ello se añaden agentes crioprotectores al medio de congelación: sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984).

El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor. De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a la mayor deshidratación celular. Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos: crioprotectores permeables y no permeables, de acuerdo a la capacidad de atravesar la membrana plasmática (Boiso, 2001; Medeiros y col., 2002).

- i. Agentes crioprotectores permeables: son sustancias permeables a través de la membrana debido a su de bajo peso molecular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Si bien la célula es permeable a estos agentes, su permeabilidad no es de la misma magnitud a la del agua. Sin embargo, atraviesan la membrana plasmática reemplazando el volumen de agua que se encuentra dentro de la célula. Consecuentemente, evitan los daños producidos por la formación de cristales de agua en el interior de la célula y mantienen el volumen celular, evitando el colapso por una deshidratación excesiva. Entre los más utilizados están el glicerol, el etilenglicol, el propanediol y el dimetilsulfóxido (García y Vila, 1984; Medeiros y col., 2002).
- ii. Agentes crioprotectores no permeables: son sustancias de alto peso molecular que no pueden atravesar la membrana plasmática y que son efectivas cuando se emplean altas velocidades de congelación. Como no penetran en la célula, no son crioprotectores propiamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular. Estos agentes suelen usarse en combinación a los agentes permeables (Boiso, 2001).

Los agentes crioprotectores no permeables como azúcares también han sido estudiados en la congelación de semen ovino. Su mecanismo de acción consiste en estimular osmóticamente una rápida deshidratación celular y de esta manera disminuir el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo. También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo. Además estos azúcares pueden interactuar con la membrana formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana plasmática (De Leeuw y col., 1993; Salamon y Maxwell, 2000; Medeiros y col., 2002).

Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular. Los más utilizados son la sacarosa, la trehalosa, la lactosa y la rafinosa (De Leeuw y col., 1993; Boiso, 2001).

El empleo de mezclas de crioprotectores está más extendido porque en la mayoría de los casos se obtienen mejores resultados que cuando se emplean las sustancias puras. De este modo, para un microorganismo dado existen sólo uno o dos crioprotectores adecuados. Se recomienda como sustancia crioprotectora de excelencia la leche descremada (sustancia proteica) por sus buenos resultados en la preservación de la viabilidad en el proceso de liofilización (Burguet-Lago y col., 2012).

La leche descremada (sólidos de leche sin grasa) en una concentración de 1%-10% a menudo se ha utilizado para la criopreservación, pero incluso con más frecuencia en la liofilización de muchos microorganismos, a veces en combinación con otras sustancias. Keith describió el efecto crioprotector de leche en *Escherichia coli* cuando se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$ . *Mycobacterium tuberculosis* suspendida en leche se mantuvo 100% viable durante al menos un año después del almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ . También se utilizó para la criopreservación de *Leptospira interrogans*, micoplasmas, *Pasteurella multocida*, y bacterias ácido-lácticas. Además, al combinarse con glicerol, fue eficaz en la protección por el frío de las bacterias y hongos fitopatógenos (Hubálek, 2003).

La leche descremada puede utilizarse de manera eficaz como medio de criopreservación potente el secado por congelación; estos agentes protegen no sólo la viabilidad sino también las propiedades funcionales de las bacterias (Praveen y col., 2009).

Se selecciona la leche descremada en polvo como medio de secado ya que es capaz de evitar la lesión celular mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular, crea una estructura porosa en el producto liofilizado que hace la rehidratación más fácil y contiene proteínas que proporcionan una capa protectora para las células (Carvalho y col., 2004).

Hasta ahora, varios mecanismos mostraron ser responsable del efecto protector ejercido por la leche descremada en la supervivencia de los microorganismos durante la liofilización. King mostró que las proteínas de leche pueden formar una capa protectora en las proteínas de la pared celular y el calcio presente en la leche aumenta la tasa de supervivencia después de la congelación o la liofilización. Sin embargo, Castro y colaboradores sugirieron que se esperaba que los sólidos de leche descremada se utilizaran para evitar lesiones celulares mediante la estabilización de los componentes de la membrana celular (Castro y col., 1995; Baokun y col., 2011).

El efecto protector de la leche descremada utilizada al 20% (peso/volumen) ha sido observado en las cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* al obtener resultados de viabilidad después de la liofilización durante los cinco años de estudio por encima de  $10^6$ UFC/mL, valores que sobrepasaron el criterio de evaluación establecido en las especificaciones de calidad del laboratorio Liorad (niveles de viabilidad igual o mayor al orden de  $10^5$ UFC/mL) por lo que se consideró que el procedimiento evaluado, mantuvo la viabilidad de los cultivos liofilizados. Se recomienda como sustancia lioprotectora de excelencia la leche descremada (sustancia proteica) por sus buenos resultados en la preservación de la viabilidad en el proceso de liofilización (Burguet-Lago y col., 2012).

Además, el uso de una solución de leche descremada al 10% mejora la viabilidad de varias especies bacterianas (*Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*) después de la descongelación e incubación prolongada a 30°C. Estos datos sugieren que una solución de congelación de la leche descremada al 10% proporcionará una mayor protección contra la pérdida de viabilidad si un congelador falla, y además puede aumentar la supervivencia a largo plazo de las poblaciones cuando se mantiene a -80°C. (Cody y col., 2008).

Aislamientos clínicos de *Streptococcus pneumoniae* han sido conservados en sangre de conejo, sangre de carnero, leche descremada o caldo glicerol-chocolate, y almacenados a -20°C o -70°C. La congelación a -70°C y la liofilización y el posterior almacenamiento a 4°C son los métodos ideales para la conservación de esta cepa (Siberry y col., 2001).

## **Liofilización**

La tecnología de liofilización tiene sus raíces en la refrigeración. También podría llamarse crío-desección en razón de su fase inicial de congelación. El término desecación se refiere a la deshidratación del producto y crío significa “frío” en griego. La crío-desección fue desarrollada en 1904 por físicos franceses (Flosdorf y Mudd, 1935; Flosdorf y Kimball, 1939).

Una referencia histórica más cercana a nuestros tiempos fueron los primeros trabajos de Louis Pasteur y otros investigadores durante la segunda mitad del siglo XIX, intentando realizar estudios metódicos de la naturaleza de material virulento, observaron la necesidad de innovar las técnicas de secado con el fin de preservarlo sin destruirlo. También resultó claro que se necesitaban medios para hacer más lentas las reacciones químicas de modo que pudieran ser estudiadas durante un período de tiempo o empleadas posteriormente bajo ciertas condiciones controladas. La conservación de bacterias, virus u otros microorganismos fueron su primera aplicación (Flosdorf y Kimball, 1939; Jennings, 1993).

Los trabajos de secado a bajas temperatura realizados antes de 1905 no incluían el uso de vacío, ya que las bombas de vacío mecánicas no estaban disponibles en aquella época, fueron Benedict y Manning en 1905 quienes la introdujeron en el proceso de liofilización. A finales de la década de 1930 resultó significativa la producción a gran escala de productos liofilizados. A través de toda la Segunda Guerra Mundial y en la posguerra, la fabricación de plasma de sangre seco, fue quizás el primer uso real de la tecnología de liofilización como un proceso productivo comercial. Otro producto liofilizado a gran escala fue la penicilina. E. W. Flosdorf y S. Mudd (1935–1940) revolucionaron la liofilización publicando diversos artículos sobre aspectos del proceso de liofilización y sus mejoras basados en la liofilización de estos productos. Aunque E. W. Flosdorf y S. Mudd en 1935 introdujeron el término “liofilizar” no fue sino hasta 1943 que el profesor Alexander Fleming propuso formalmente el término liofilización,

que proviene de los términos “lueo” o “solvente” y “phileo” o “amigo”, en griego (Flosdorf y Mudd, 1935; Flosdorf y Kimball, 1939; Rey, 1975; Jennings, 1993; Fournier, 2006).

La liofilización es un proceso de conservación mediante sublimación utilizado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles. Es el más adecuado proceso de preservación de productos biológicos conocido, porque une los dos métodos más confiables de conservación, la congelación y la deshidratación. Sin conservadores o productos químicos, es el proceso más adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, derivados sanguíneos, algas, así como frutas, vegetales, carnes, peces y alimentos en general. En este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente. Al producto obtenido se le llama “liófilo” (derivado de *lio*: Solvente *philo*: amante o muy afín) nombre que expresa su propiedad de muy fácil hidratación y reintegración a su estado original (Ramírez y Cañizares, 2003).



Figura 1. Liofilizador de laboratorio.

Consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas; que pasa directamente a un estado de vapor debido a que no hay presión molecular que lo impida. En este método, las muestras que contienen la suspensión de microorganismos, son previamente congeladas 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; 10µm de Hg), lo que provoca la evaporación del hielo con la consiguiente pérdida de calor que se produce en el proceso. Por lo tanto, un liofilizador necesita una bomba de alto vacío, un condensador y aditamentos (Figura 1) para el funcionamiento principal. No obstante, también se requiere de una bomba adicional y un accesorio de entradas múltiples si se desean elaborar ampollas al vacío que portarán las bacterias que se desean preservar.

No altera la estructura físico-química del material, pero permite su preservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad microbiológica. Es ideal para conservar productos alimenticios, farmacéuticos y biológicos, que no deben calentarse ni siquiera a temperaturas moderadas. Además, es apropiada para la preservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporos, actinomyces y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos filamentosos (Alvarado, 1996; Geankoplis, 1999).

Una vez que las bacterias se liofilizan, éstas pueden permanecer en un lugar fresco a una temperatura que oscile entre los 15°C a los 25°C, esto significa guardar 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.

Los protocolos óptimos para la preparación del liofilizado varían ampliamente entre especies, e incluso entre las cepas. Sin embargo, en vista de los resultados revisados anteriormente, se sugiere una metodología básica (necesariamente general) para la preparación, el almacenamiento y la rehidratación del liofilizado. Entre las condiciones para garantizar un exitoso proceso de liofilización destacan las siguientes:

- Condiciones de crecimiento: el primer paso debe ser la selección de unos pocos medios de cultivo comercial disponible para cierta bacteria en particular; el rendimiento de cada medio en la supervivencia durante la liofilización y posterior almacenamiento debe entonces ser investigado. En particular, el efecto de la adición de NaCl para cada uno de tales medios también debe evaluarse. Los resultados de estas medidas preliminares

deberían permitir una para elegir el mejor medio (con o sin NaCl) para la preservación de una bacteria dada durante el almacenamiento prolongado.

- Condiciones de secado: a falta de otra información pertinente sobre los cultivos específicos de laboratorio, la leche descremada en polvo se debe elegir como medio de secado. El azúcar (o azúcares) presente en el medio de crecimiento seleccionado debe ser el primer compuesto(s) a ensayar como agente de protección(s). Otros compuestos, por ejemplo, sorbitol, MSG, adonitol y trehalosa, son eficaces en la protección de las bacterias durante el secado y el almacenamiento posterior.
- Condiciones de almacenamiento: estudios previos han demostrado que las condiciones de almacenamiento son críticas para la recuperación de las células liofilizadas. Por lo tanto, los liofilos deben ser almacenados bajo vacío, manteniendo controlada la actividad de agua y expuesto a la oscuridad.
- Condiciones de rehidratación: el efecto positivo de los compuestos añadidos al medio de secado parece referirse directamente a la composición del medio de crecimiento; demostró un aumento significativo en la viabilidad bacteriana cuando se utilizó la misma solución probada como protector en el medio de secado para rehidratar muestras secas. Por lo tanto, el uso del mismo compuesto en el crecimiento, el secado y el medio de rehidratación debe ser investigado (Carvalho y col., 2004).

Así a largo plazo la liofilización resulta menos costosa que la ultracongelación. Además, la ventaja máxima que representa liofilizar una cepa bacteriana, es que es una manera de preservar a largo plazo; se dice que las muestras pueden conservarse por más de 25 años. El punto limitante del método es que aún hay poco conocimiento en la forma adecuada para preservar a las bacterias por este método y de acuerdo con los datos con que se cuenta no existe un lioprotector universal para todas las cepas bacterianas y se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular (Morgan y col., 2006).

## Equipo de Liofilización

La función básica del liofilizador es crear el entorno necesario para el proceso de liofilización. Esta sección, en general, no se ocupará de la operación de este equipo, sino del efecto que diversos componentes en los secadores pueden tener sobre el proceso (Jennings, 1993).

Los equipos de pequeña escala, tipo planta piloto o de laboratorio constan exactamente de las mismas partes representadas en la Figura 2, con la diferencia que se ha integrado todas éstas en un solo equipo. En esta misma figura se ilustra un esquema de un liofilizador típico, con un condensador externo, que consta de tres componentes principales: la cámara de secado, el condensador y el sistema de vacío. A continuación se describe cada uno de ellos:

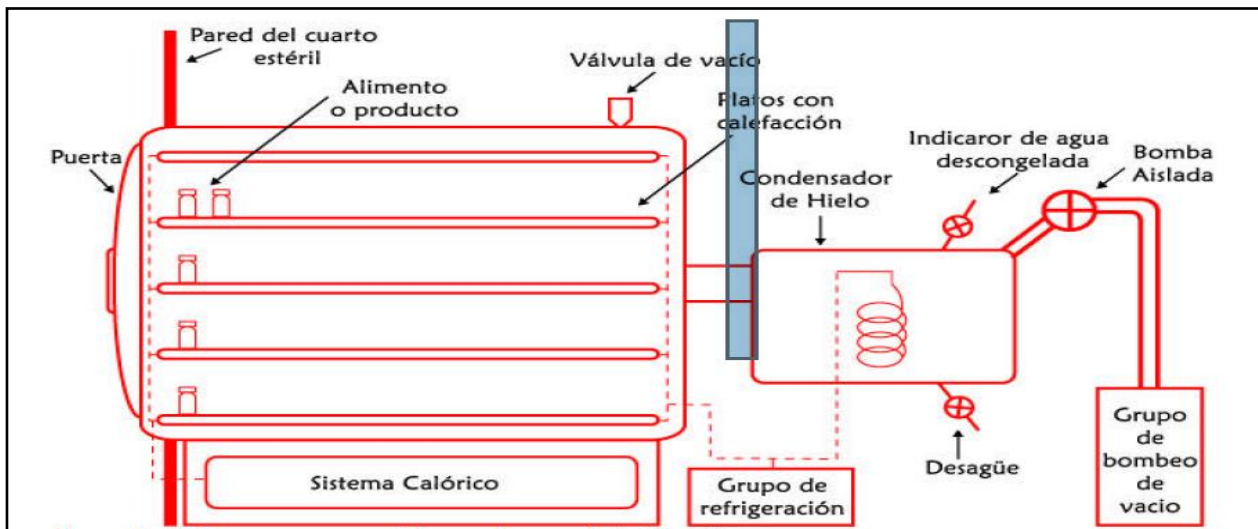


Figura 2. Esquema general de un sistema de liofilización (Ramírez, 2006).

- Cámara del liofilizador: la cámara del secador sirve al proceso de liofilización proporcionando un entorno limpio, en ocasiones estéril, para el proceso y proporciona tanto las temperaturas como presiones necesarias para que se lleve a cabo la congelación y el secado del producto.
- Condensador: la principal función del condensador es eliminar los vapores condensables antes de que entren en el sistema de bombeo de vacío.



- Sistema de vacío: está conectado a la cámara del condensador y su función es proporcionar las presiones necesarias para las fases de secado primario y secundario. Los dos rasgos principales de un sistema de vacío que requieren consideración son la tubería de comunicación con el condensador y la naturaleza de la bomba de vacío.
- Instrumentación: es de gran importancia, ya que el logro de un óptimo producto requiere un sistema de control que reproduzca el proceso de liofilización, siempre que esté dentro de los límites del equipamiento y de un sistema de recolección de datos que verifique la consistencia del proceso.

### Etapas del Proceso de Liofilización

La liofilización involucra varias etapas (Figura 3):

- Congelación.
- Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, generalmente a muy baja presión (figura 4), generalmente se estudia en dos etapas: etapa primaria y secundaria de secado.
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

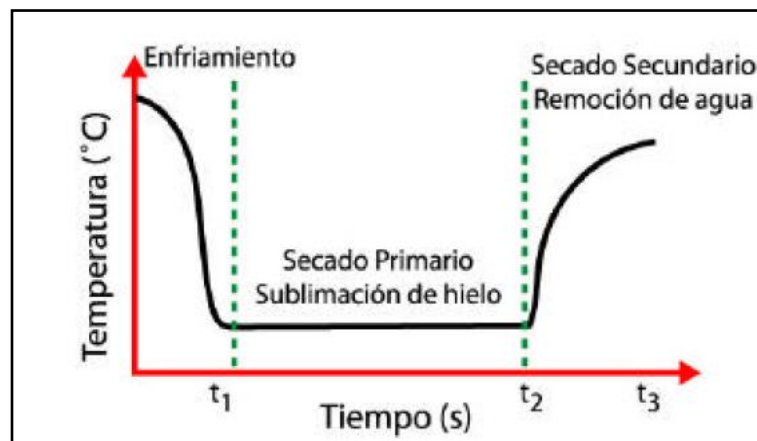


Figura 3. Pasos del proceso de liofilización (Ramírez, 2006).

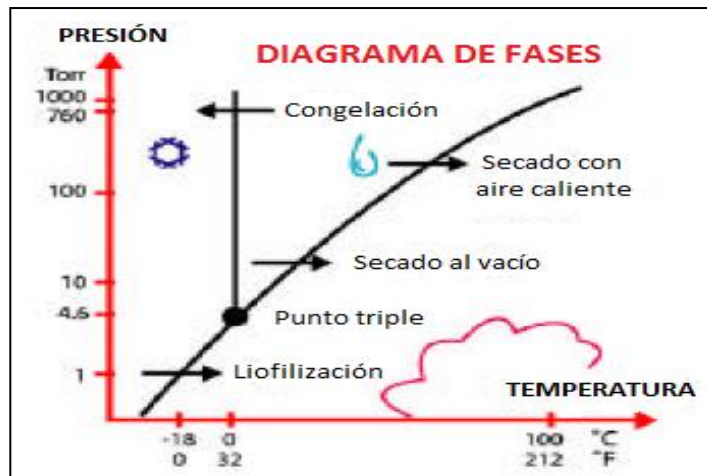


Figura 4. Diagrama de fases del agua y sistemas de secado (Ramírez, 2006).

En la liofilización el material original está constituido por un núcleo central de material congelado. A medida que el hielo se sublima, el plano de sublimación, que se inicia en la superficie exterior, penetra al interior dejando atrás una corteza porosa del material ya seco. El calor para el calor latente de sublimación del hielo equivalente a 2838KJ/Kg, procede por conducción a través de la corteza de material seco. En algunos casos, también se conduce a través de la capa congelada desde la parte posterior. El vapor de agua que se forma se transfiere a través de la capa de material seco. El agua congelada se sublima a menos 0°C y a una presión de 6.27mBar o menos. Por consiguiente, las transferencias de calor y de masa se verifican simultáneamente (Fellows, 2000).

Durante este proceso hay absorción de calor y hay que evitar que la mezcla supere la temperatura eutéctica, a fin de que durante todo el proceso permanezca en estado sólido. Procediendo de este modo, los productos orgánicos termolábiles conservan sus propiedades indefinidamente y recuperan su forma y estado primitivo al hidratarlos. En los estudios biológicos la liofilización supone el poder conservar indefinidamente cepas de bacterias y virus sin necesidad de resiembras.

En el secado mediante la liofilización se distinguen tres fases o etapas que se esquematizan en la Figura 4. Cuando en el proceso de liofilización comienza el calentamiento empieza a formarse un frente de sublimación o interfase entre la capa seca y la capa congelada

de la muestra el cual avanza progresivamente, y para un determinado instante, a una temperatura de interfase le corresponde una determinada presión de saturación. La transferencia de masa ocurre por la migración de vapores a través de la capa seca de la muestra bajo la acción de una diferencia de presión, esta transferencia es alta cuando la diferencia de presión es grande generalmente, al liofilizar adecuadamente un material se puede almacenar por períodos muy largos con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, físicas, químicas y biológicas (Orrego, 2003).

En la Figura 5 se ilustra el proceso de liofilización de un material. El calor transferido desde la fase gaseosa por conducción, convección o radiación, llega a la superficie seca y se transfiere por conducción hasta la capa congelada. En algunos casos, el calor también pasa a través del material congelado para llegar al plano de sublimación. El tiempo total de secado debe ser lo suficientemente amplio como para que el contenido final de humedad sea inferior al 5% en peso, y evitar así la degradación del producto final durante su almacenamiento. Las temperaturas máximas que se alcanzan en alimentos secos y productos congelados deben ser bastante bajas para mantener la degradación a un mínimo. El proceso más común de liofilización se basa en que los gases que rodean al material suministran a la superficie del sólido el calor de sublimación necesario. Después, el calor se transfiere por conducción a través del material seco hasta la superficie congelada. En la Figura 6 se muestra el modelo simplificado de Sandall y colaboradores (Geankoplis, 1999).

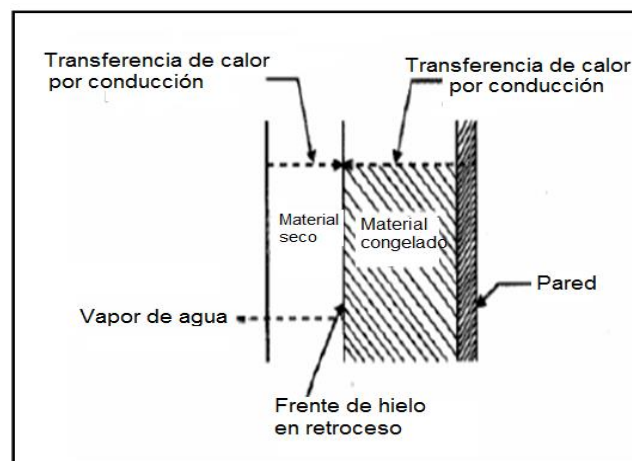


Figura 5. Transferencia de calor y masa en el secado por congelación (Ramírez, 2006).

En la Figura 6 el flujo específico de calor a la superficie del material se verifica por convección, y una vez en el sólido seco, por conducción hasta la superficie de sublimación. El flujo de calor a la superficie es igual al que pasa por el sólido seco, suponiendo un estado pseudo estacionario. Los perfiles de temperatura y humedad en el interior del producto durante la liofilización dependen de las velocidades de transferencia de masa y calor. El calor se transfiere a través del frente de sublimación o línea frontera entre las fases congelada y seca del producto. Dependiendo de la fuente de calor la transferencia podrá ser a través de la capa congelada, la capa seca o ambas (Orrego, 2003).

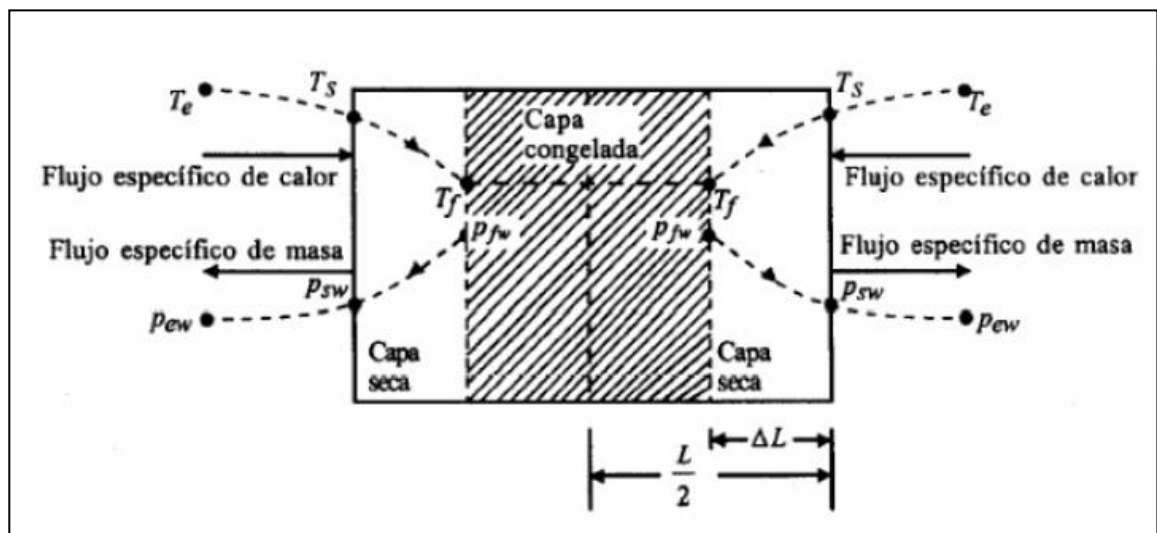


Figura 6. Modelo para el frente de hielo en retroceso en el secado por congelación (Ramírez, 2006).

Etapa de congelación, indica que cada producto debe congelarse de una manera tal que garantice que sufrirá pocas alteraciones en el proceso posterior de sublimación. Se debe conocer con precisión:

- ✓ La temperatura en la que ocurre la máxima solidificación.
- ✓ La velocidad óptima de enfriamiento.
- ✓ La temperatura mínima de fusión incipiente.

Se busca que el producto ya congelado tenga una estructura sólida sin intersticios en los que haya líquido concentrado para propiciar que todo el secado ocurra por sublimación (Orrego, 2003).

Al disminuir la temperatura del sistema, el agua cristaliza y los demás componentes se concentran en los intersticios que se forman entre los cristales de hielo. Una buena parte de los productos que se liofilizan van acompañados de reguladores de pH o simplemente de sales remanentes del proceso extractivo. También encontramos mezclas complejas (como en alimentos, sueros, etc.) o microorganismos resuspendidos en un medio previamente seleccionado. Alguno de los componentes, al concentrarse durante la congelación, pueden cristalizar formando eutécticos y otros se mantienen líquidos, llegando a solidificar en estado amorfo. La hiperconcentración de los intersticios puede provocar la disminución de las características biológicas, farmacéuticas o nutricionales de las sustancias presentes, debido fundamentalmente a la proximidad de los electrolitos a las proteínas (Levine y Slade, 1988; Pikal, 1990).

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultrarrápida y vitrificación. En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo (Rall y Fahy, 1985).

Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5°C y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula. La cristalización en

el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de criocentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata. El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente. Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985; Grossmann y Santaló, 1991; Holt, 2000; Boiso, 2011).

Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células. La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente. Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula. Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular. La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática. Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del producto a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular (Mazur, 1984; Boiso, 2011).

La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular. Mazur en 1984, postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a

temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Mazur, 1984; Grossmann y Santaló, 1991; Holt, 2000; Kumar y col., 2003).

Secado primario por sublimación del hielo: el proceso de secado como tal puede ocurrir o no a bajas presiones pero en tales condiciones es mucho más eficiente el proceso difusivo. El paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que es suministrada en alto vacío pues la interfase de secado se mueve hacia el interior de la muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas (sistemas liofilizados en bandeja, sin granular) o secas (en granulados), generándose un considerable riesgo de fusión del material intersticial o quemar la superficie del producto que ya está seco (Orrego, 2003).

Sublimación es la condensación directa de vapor a sólido. Un proceso de sublimación significa un procedimiento mediante el cual una sustancia sufre una transición de éstas o una combinación de ellas. El proceso de sublimación es mucho más eficiente a presiones mínimas debido a que el agua se extrae por un impulso originado por el gradiente de presión total. La sublimación se utiliza para materiales que no se pueden purificar con facilidad mediante las operaciones unitarias mejor conocidas. Se ha observado un interés creciente por la separación de mezclas de componentes volátiles mediante métodos de sublimación. Mafart en 1994 reportó que esta primera etapa generalmente dura de 10 a 15 minutos. (Gillot y Goldberger, 1969; Mafart, 1994; Perry, 1997; Coral y col., 2005).

Las tres fases que se distinguen en la Figura 7 son:

- a) Fase 1: Llamada etapa conductiva. Inicialmente, por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto; en ella se lleva a cabo la mayor parte de remoción de agua del producto (entre un 75%-90 %), siendo el mecanismo preponderante la transferencia de calor por conducción.
- b) Fase 2: Primera etapa difusiva. Muestra un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado.

- c) Fase 3: Segunda etapa difusiva. La velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. Esto debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación. Puesto que la difusividad de los aromas disminuye sensiblemente cuando la humedad es pequeña es posible en esta etapa incrementar la temperatura de la calefacción y del producto hasta valores del orden de 50°C, dependiendo del material que se trate (Orrego, 2003).

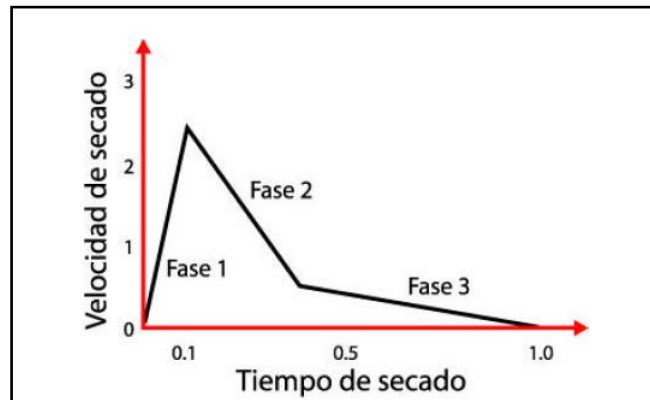


Figura 7. Etapas del proceso de liofilización (Ramírez, 2006).

Cualquier vial que no está rodeado por otros viales a su alrededor (6 mínimo) se define como un vial de borde. Durante el secado primario, los viales de borde reciben la transferencia de calor adicional a través de la radiación de las paredes y la puerta del liofilizador, que están a una temperatura superior a la estantería. Esta diferencia de temperatura resulta en una mayor temperatura del producto y menor tiempo de secado primario para los viales de borde en comparación con el resto del juego (es decir, los viales centro). Durante el secado primario, es fundamental garantizar que la temperatura del producto se mantenga por debajo del límite máximo permitido no sólo para los viales del centro, sino también para los viales de borde para mantener la calidad del producto en todo el juego. Además, el efecto del vial borde es más dominante en un secador a escala de laboratorio debido a la puerta de plexiglás y las superficies con alta emisividad (proporción de radiación térmica emitida por una superficie u objeto debido a una diferencia de temperatura con su entorno). En un secador a escala de producción masiva, la puerta y las superficies son de acero inoxidable pulido con relativamente baja emisividad. Estas diferencias en el diseño del secador necesitan ser consideradas cuando



se ajusta el proceso de liofilización para garantizar que el perfil térmico del producto no se vea alterado por ambos: viales de borde y de centro (Patel y col., 2010).

En el secado secundario, se evapora el agua no congelable (ligada), logrando que el porcentaje de humedad final sea menor al 2%. (Jennings, 1993).

Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas: los productos liofilizados y adecuadamente empacados, pueden ser guardados por largos periodos de tiempo ya que en buena medida retienen las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas de sus estados frescos.

La liofilización, reduce las pérdidas de calidad debidas a deterioro por reacciones químicas, causado por degradación enzimática y no enzimática. Sin embargo, la oxidación de lípidos, inducida por los bajos niveles de humedad a los que lleva el producto durante el secado, es un problema a considerar para los productos liofilizados. Las reacciones de oxidación de lípidos se controlan, empacando los productos liofilizados en recipientes impermeables al oxígeno. La degradación no enzimática es evitada por la rápida transición de alto a bajo contenido de humedad. El uso de rangos bajos de temperatura también evita la desnaturalización de proteínas en los productos liofilizados (Orrego, 2003).

### **Ventajas y Desventajas de la Liofilización**

La principal ventaja de esta técnica es la calidad superior del producto final. Sin embargo, visto el costo del proceso, la liofilización queda generalmente reservada para productos con un alto valor agregado, semejantes a los productos farmacéuticos o alimentos para bebés y ciertas especies. Una de las causas de este elevado costo es la longevidad del producto procesado. En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación.

Se han reportado varias ventajas sobre el proceso de liofilización, entre las cuales destacan las siguientes: previene daño térmico, los volátiles diferentes del agua son retenidos,

el producto se reconstituye y el encogimiento es despreciable. Y desventajas como: largos tiempos de procesamiento, alto consumo de energía, costo de inversión inicial alto, alto precio del producto final (Pardo, 2002).

En síntesis ofrece ventajas tan importantes como la preservación y transporte fácil de los productos, la ausencia de temperaturas altas, la inhibición del crecimiento de microorganismos, o la recuperación de las propiedades con su rehidratación.

### **Preservación de *Streptococcus pyogenes***

Históricamente el estreptococo ha sido un importante patógeno de la raza humana. En la era pre-antibiótica los estreptococos se contaban entre los patógenos más frecuentes y producían una mortalidad significativa. Desde la introducción de los antibióticos las enfermedades estreptocócicas se han controlado y las muertes son infrecuentes. El principal patógeno para el hombre es el estreptococo del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), es la causa bacteriana más frecuente de faringitis aguda y también es responsable de una diversidad de infecciones cutáneas y sistémicas como fascitis necrosante y shock séptico; tiene gran importancia desde el punto de vista clínico al provocar secuelas no supurativas, como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda post-estreptocócica. Motivo por el cual es muy importante un diagnóstico en forma correcta y oportuna, para iniciar un tratamiento adecuado que resuelva el problema, pero principalmente para prevenir las posteriores complicaciones de la infección, como lo son las complicaciones supurativas y no supurativas. Esta bacteria se presenta microscópicamente como células esféricas de 0.6-1.0µm de diámetro, se agrupan en forma de cocos en cadenas de longitud variable en muestras clínicas o cuando crecen en medios líquidos enriquecidos. La ultraestructura de los estreptococos del grupo A es típica de otras bacterias gram positivas por su pared celular rígida, su membrana plasmática interna con vesículas mesosómicas, ribosomas citoplasmáticos y nucleóide. Además, por fuera de la pared celular se encuentran apéndices similares a fimbrias que contiene la proteína M específica de tipo. Son inmóviles, no formadores de esporas, catalasa negativos, anaerobios facultativos y en agar sangre crecen formando colonias traslúcidas o transparentes de superficie lisa, de 0.3 a 0.5mm de diámetro con un halo beta hemolítico alrededor. La mayor parte de los estreptococos del grupo A son β-hemolíticos en agar-sangre de carnero, si bien la presencia de pequeñas

cantidades de carbohidratos fermentables (0.05% de glucosa) puede disminuir la reacción alrededor de las colonias superficiales. La sangre humana no debe ser utilizada salvo que se tenga la certeza de que está libre de sustancias inhibitoras. Los estreptococos del grupo A varían de manera considerable en la morfología de sus colonias. Las cepas que sintetizan ácido hialurónico producen colonias mucoides que se colapsan al continuar la incubación como resultado del secado o de la actividad de la hialuronidasa (Rivera, 1998; Zinsser, 1994).

Pueden diferenciarse de forma más precisa en serogrupos en función a las características antigénicas de los hidratos de carbono presentes en su pared celular, esta siendo los más importantes los grupos A, B, C, D, F y G, donde *S. pyogenes* pertenece al grupo A. Producen dos tipos de hemolisinas, la estreptolisina O y la estreptolisina S. La estreptolisina O, deriva su nombre por su labilidad al oxígeno, es inhibida por el oxígeno de forma reversible y por el colesterol en forma irreversible; además de su efecto lítico sobre los eritrocitos es tóxica para distintos tipos celulares como leucocitos, monocitos y células en cultivo. La estreptolisina S, producida por estreptococos en presencia de suero o de otras sustancias como albúmina, es estable al oxígeno pero termolábil, no es antigénico y al igual que la estreptolisina O, es tóxica para distintos tipos celulares.

Nutricionalmente son bacterias exigentes, requieren de medios complejos enriquecidos con sangre para su desarrollo óptimo. Los requerimientos nutricionales mínimos de los estreptococos son complejos a causa de la incapacidad del microorganismo para sintetizar muchos de los aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas que necesita. El medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de esta bacteria es agar sangre, pero puede crecer bien en agar chocolate, infusión cerebro corazón, y en otros medios de cultivo muy enriquecidos. (Zinsser, 1994; Romero, 2007; Valencia, 2009).

La preservación de cepas es importante para todos los laboratorios, pero para los laboratorios pequeños surgen muchas dificultades con algunas bacterias fastidiosas, en particular las cepas estreptocócicas, ya que generalmente la única manera fácil de preservación es la congelación a -20°C y en la mayoría de estos establecimientos, no hay equipos capaces de alcanzar esta temperatura (Pierre y col., 1996).

La conservación de la biodiversidad microbiana se debe dirigir a mantener viables y estables, tanto fenotípica como genotípicamente, especímenes representativos con

aplicabilidades concretas, para lo cual es necesario desarrollar técnicas de conservación específicas para cada una de ellas, previendo la reducción de efectos adversos en el proceso. El Cepario de Microbiología de la Universidad de Sonora, que proporciona los cultivos bacterianos en primer término para el desarrollo de prácticas de laboratorio del área de microbiología, desde hace muchos años posee una diversidad de microorganismos bacterianos, los cuales han sido conservados con almacenamientos a mediano plazo (congelación), con pases continuos en el caso de microorganismos bacterianos de difícil recuperación y a corto plazo utilizando agar base sangre en pico de flauta a temperatura de refrigeración con resultados satisfactorios. El mayor problema de estos métodos son las resiembras, ya que constituyen una posibilidad de cambio en su comportamiento, y por lo tanto, si bien estos microorganismos conservan sus características por un tiempo, no se tendría certeza de que el microorganismo haya sufrido cambios transitorios o permanentes. Esta observación llevó a valorar otros métodos que sean más reproducibles y confiables, con el fin de garantizar la calidad del microorganismo conservado (Sánchez y col., 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

Se utilizaron 3 cepas de *Streptococcus pyogenes* (provenientes de aislamientos clínicos) donadas por el Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Ignacio Chávez de ISSSTESON.

Además se utilizó *Streptococcus. pyogenes* ATCC 19615 como cepa control.

### Criterios de Inclusión

- Todas aquellas cepas que fueron identificadas como *Streptococcus. pyogenes* con base a sus características macroscópicas de morfología colonial y características microscópicas, así como la serología correspondiente al grupo A de Lancefield. Además de la identificación mediante el sistema de Microdilución Vitek 2.
- Todas aquellas cepas que no presentaron contaminación de ningún tipo.
- Viabilidad para inóculo inicial de al menos  $10^7$ UFC/mL (Simione y Brown, 1991).

### Criterios de Exclusión

- Todas aquellas bacterias que no cumplieron con los requerimientos descritos dentro de los criterios de inclusión.

### Equipo

- Liofilizador LABCONCO (modelo Freeze Dryer 6)
- Ultracongelador ThermoFisher Scientific (modelo ULT1786-4-A47)

- Refrigerador Torrey (modelo R36)

### **Obtención y Caracterización de Cultivos Axénicos de Cepas de *Streptococcus pyogenes***

En el Hospital Dr. Ignacio Chávez se identificaron las cepas bacterianas de la siguiente manera: el aislamiento se obtuvo a partir de un cultivo de agar sangre incubado de 24 a 48 horas a 37°C, la identificación se llevó a cabo a través del Sistema de Microdilución Vitek 2. El microorganismo se sembró en agar base sangre para verificar la pureza, se realizó tinción Gram para determinar su morfología, además de la prueba de sensibilidad a la bacitracina. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas y serológicas tales como prueba de aglutinación de látex para la identificación de *Streptococcus* grupos A, B, C, D, F y G (BD BBL Streptocard Enzyme Latex Test) (Forbes, 2009).

### **Suspensión Bacteriana Inicial**

Con un hisopo se tomó una muestra de la bacteria previamente aislada e identificada, contenida en infusión cerebro-corazón, se sembró masivamente en una placa de agar base sangre y se dejó incubar por 24 horas a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación y observando un crecimiento confluyente, se procedió a cosechar utilizando aproximadamente 3mL de infusión cerebro-corazón para este fin. Una vez obtenida la suspensión, se colocó en un matraz con 50mL de infusión cerebro-corazón y se incubó por 24 horas a 37°C. Esta suspensión masiva se utilizó como parte del inóculo inicial para someterse a la liofilización y para el recuento inicial, previo a la congelación.

### **Congelación**

De la suspensión anterior se tomaron 250µL adicionándole 250µL de infusión cerebro-corazón con leche descremada al 2%, misma que se agregó en un vial estéril de 1mL de capacidad. Una

vez incorporado el inóculo correspondiente, los viales se refrigeraron (Refrigerador Torrey modelo R36) a 4°C durante 30 minutos, para posteriormente ser sometidos a congelación empleando un ultracongelador (Ultracongelador ThermoFisher Scientific modelo ULT1786-4-A47) a condiciones de -80°C por al menos 24 horas

### **Cuantificación de Bacterias Viable**

Se utilizó la técnica de cuenta de bacterias por placa vaciada de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, se procedió de la siguiente manera:

A partir de la suspensión, se realizaron diluciones seriadas en base 10, mezclando 1mL de suspensión bacteriana con 9mL del diluyente que en este caso fue agua peptonada. Una vez obtenidas estas diluciones, se tomó 1mL de cada una de ellas, y se añadió a un tubo con 9mL de agar para métodos estándar fundido a una temperatura de 40-45°C, se homogeneizó, se vertió en una placa Petri estéril, se esperó a que solidificara y se incubó invertida a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se procedió a la cuenta de colonias, seleccionando aquella placa donde se observaron entre 30 y 300 colonias. El número de colonias por el factor de dilución se reportó como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

Este procedimiento se repitió 3 veces para cada dilución, antes de la congelación a -80°C y después de la liofilización. El proceso antes descrito se realizó en tres experimentos independientes por cada cepa, incluyendo la cepa control.

### **Siembra por Extensión en Placa para la Determinación de Pureza Pre Liofilización**

Se seleccionaron al azar 3 tubos de ensaye correspondientes a las diluciones realizadas para la cuantificación de bacterias y su posterior congelación. Se tomaron 150µL de cada una y se depositaron en una placa de agar sangre, respectivamente. La muestra se extendió uniformemente sobre la superficie del agar utilizando un rastrillo de plástico estéril. Las placas

se incubaron invertidas a 37°C durante 24 horas. Se observó la morfología de las colonias y su beta hemólisis característica en cada una de las placas, se realizó tinción Gram y la prueba de aglutinación de látex para la identificación de *Streptococcus* grupos A, B, C, D, F y G (BD BBL Streptocard Enzyme Latex Test) (Fernández del Barrio y col., 1994).

## **Liofilización**

Los viales previamente congelados se liofilizaron en un equipo LABCONCO (modelo Freeze Dryer 6), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante para la liofilización de bacterias, -53°C y vacío de al menos 0.250mBar, por 24 horas.

## **Cuantificación de Bacterias Viables Post Liofilización**

Se seleccionaron tres viales liofilizados (24 horas después de su liofilización) completamente al azar para realizar la cuenta de bacterias por el método de placa vaciada siguiendo el procedimiento citado en apartado anterior, reconstituyendo al líofilo de la siguiente manera: se agregó 1mL de agua peptonada al 0.1% para hidratarlo y reactivarlo. Una vez reconstituido se realizaron series de diluciones base 10 como se describió anteriormente, siguiendo todo el procedimiento hasta lograr la cuantificación y mediante el cálculo correspondiente obtener UFC/mL. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada dilución.

## **Siembra por Extensión en Placa para la Determinación de Pureza Post Liofilización**

Se seleccionaron al azar 3 tubos de ensaye correspondientes a las diluciones realizadas para la cuantificación de bacterias post-liofilización. Se tomaron 150µL de cada una y se depositaron en una placa de agar sangre, respectivamente. La muestra se extendió uniformemente sobre la superficie del agar utilizando un rastrillo de plástico estéril. Las placas se incubaron invertidas a 37°C durante 24 horas. Se observó la morfología de las colonias y su beta hemólisis



característica en cada una de las placas, se realizó tinción Gram y la prueba de aglutinación de látex para la identificación de *Streptococcus* grupos A, B, C, D, F y G (BD BBL Streptocard Enzyme Latex Test) (Fernández del Barrio y col., 1994).

### **Control de Calidad**

Todos los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron incubados 24 horas previas a su uso para asegurar su esterilidad.

### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS, con una significancia estadística de 95% ( $p < 0.05$ ). Para la búsqueda de diferencias significativas entre medias de las concentraciones obtenidas entre el inóculo inicial y el resultante después de la liofilización se utilizó la prueba de Wilcoxon y para la comparación de la cepa control con respecto a las demás se utilizó Kruskal Wallis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención y Caracterización de Cultivos Axénicos de *Streptococcus pyogenes*

Se confirmó la pureza de las cepas, considerándose las características macro, microscópicas y bioquímicas. *Streptococcus pyogenes* presentó en el agar sangre un crecimiento uniforme con colonias características, de 0.3-0.5 mm de diámetro, traslúcidas de superficie lisa con un halo beta hemolítico alrededor, al microscopio cocos agrupados en forma de cadenas Gram positivos, de longitud variable. Se realizó la prueba de la bacitracina encontrándose como sensible, además se confirmó que es perteneciente al grupo A por medio de la prueba serológica de aglutinación de látex para la identificación de *Streptococcus* grupos A, B, C, D, F y G.

### Obtención de Suspensión Bacteriana para Inóculo Inicial

Se obtuvo la suspensión bacteriana para utilizarse como inóculo inicial, de acuerdo a la metodología antes descrita en materiales y métodos, el inóculo inicial promedio de las cepas (99, 100, 101 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) se muestra en la Tabla 1. Los datos anteriores fueron obtenidos mediante la cuantificación de bacterias viables de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Estas concentraciones fueron comparadas con los resultados obtenidos después de la liofilización previa congelación a -80°C.

Tabla 1. Cuenta pre liofilización promedio de cepas de *Streptococcus pyogenes*.

CEPA	CUENTA INICIAL (UFC/mL)	PROMEDIO (UFC/mL)
99	$1.8 \times 10^8$	$1.28 \times 10^8$
	$1.1 \times 10^8$	
	$9.4 \times 10^7$	
100	$1.8 \times 10^9$	$1.79 \times 10^9$
	$3.3 \times 10^9$	
	$2.6 \times 10^8$	
101	$2.5 \times 10^7$	$1.96 \times 10^8$
	$5.3 \times 10^8$	
	$3.4 \times 10^7$	
ATCC 19615	$7.1 \times 10^8$	$3.63 \times 10^8$
	$1.6 \times 10^8$	
	$2.2 \times 10^8$	

### Cuantificación de Bacterias Viables Post Liofilización

El inóculo post liofilización promedio de las cepas (99, 100, 101 y ATCC 19615) se muestra en la Tabla 2. Los datos anteriores fueron obtenidos mediante la cuantificación de bacterias viables de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Después de someter las bacterias al proceso de liofilización se obtuvo el 92%, 93% 89% y 95% de sobrevivencia respectivamente en las 4 cepas (99, 100, 101 y ATCC19615).

Tabla 2. Cuenta post liofilización promedio de cepas de *Streptococcus pyogenes*.

CEPA	CUENTA FINAL (UFC/mL)	PROMEDIO (UFC/mL)
99	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$
	$2.2 \times 10^7$	
	$3.8 \times 10^7$	
100	$1.2 \times 10^9$	$5.63 \times 10^8$
	$4.6 \times 10^8$	
	$3.0 \times 10^7$	
101	$8.6 \times 10^6$	$5.99 \times 10^7$
	$1.7 \times 10^8$	
	$1.1 \times 10^6$	
ATCC 19615	$6.8 \times 10^7$	$1.06 \times 10^8$
	$1.2 \times 10^8$	
	$1.3 \times 10^8$	

### Efecto de la Leche Descremada como Agente Crioprotector

Al utilizar leche descremada como crioprotector se lograron buenos valores de recuperación, coincidiendo con lo obtenido en el trabajo de Duarte y Mancera (2011), quienes obtuvieron el 95% de sobrevivencia utilizando leche descremada al 1% para *Staphylococcus aureus*.

Pese a que varios autores recomiendan el uso de leche descremada a una concentración del 10%, en el trabajo de Duarte y Mancera (2011) se demostró de igual manera que existe una diferencia significativa en la viabilidad post liofilización entre una concentración del 5 y 1%, demostrando que el uso de este crioprotector en mayor concentración dificulta el posterior manejo de la cepa, ya que al haber mayor concentración de solutos en el exterior de la célula se incrementa la presión osmótica, lo que puede conducir a una menor sobrevivencia del microorganismo en cuestión. Por ello es necesario realizar lavados para eliminar el exceso de

leche descremada lo cual conlleva una mayor manipulación elevando el riesgo de contaminación.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de UFC/mL de las 4 cepas antes y después de la liofilización, obteniéndose un valor de  $p=0.109$  (Wilcoxon). Figuras 8, 9, 10 y 11.

Del mismo modo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al proceso de liofilización entre las cepas analizadas con respecto a la cepa control (*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), obteniéndose un valor de  $p=0.204$  (Kruskal Wallis), como se muestra en la Figura 12.

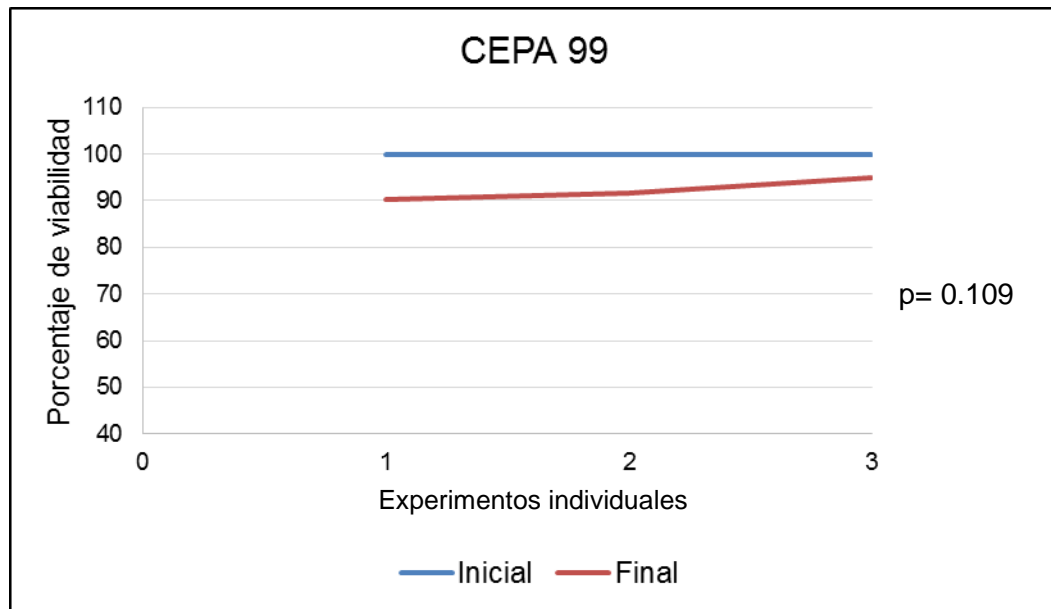


Figura 8. Porcentaje de viabilidad de la cepa 99.

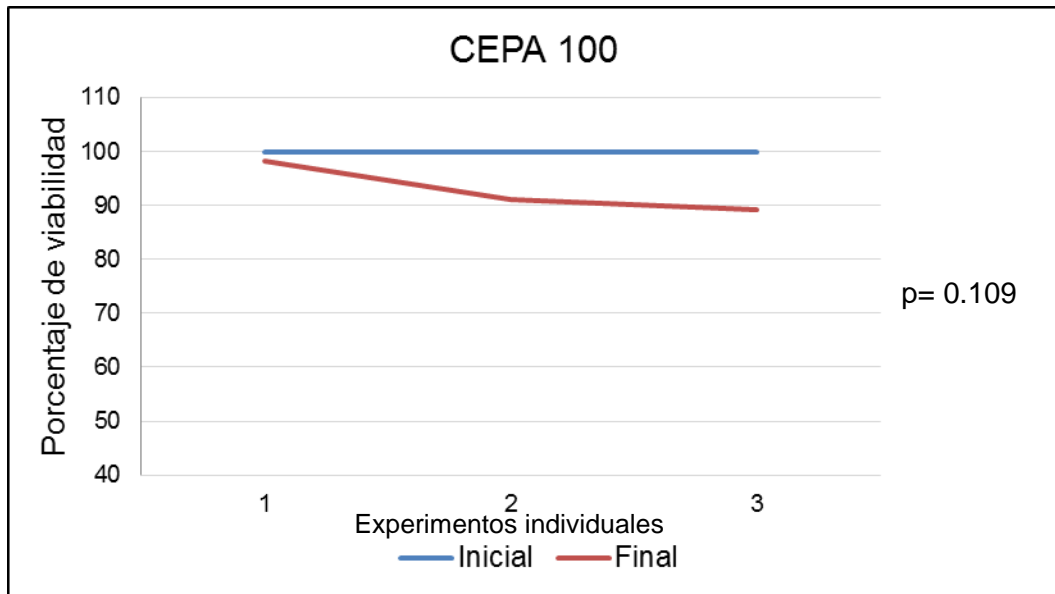


Figura 9. Porcentaje de viabilidad de la cepa 100.

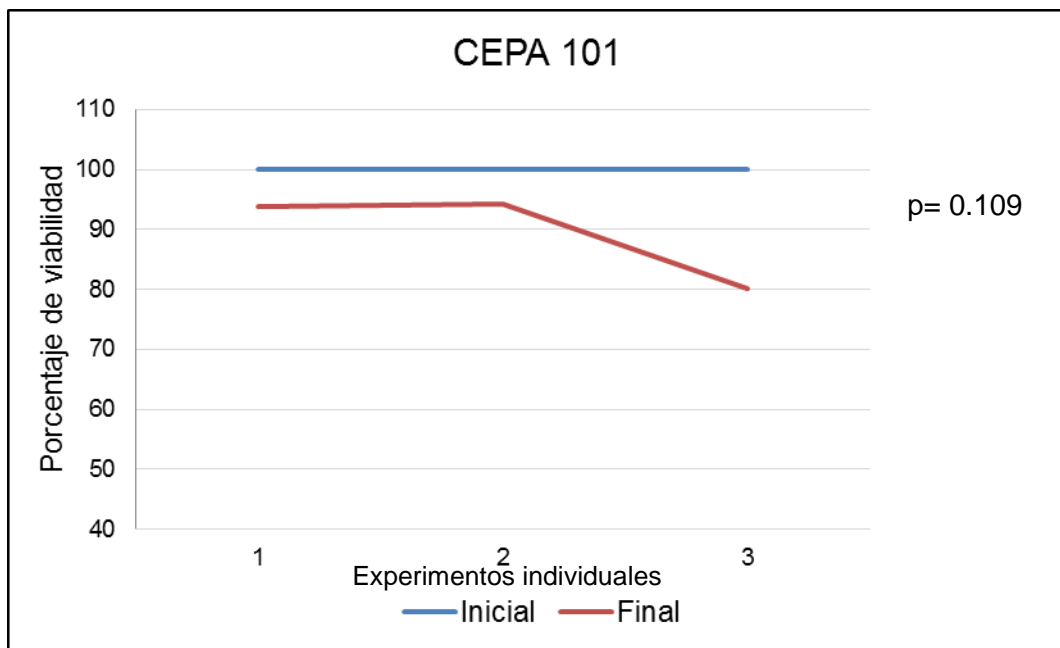


Figura 10. Porcentaje de viabilidad de la cepa 101.

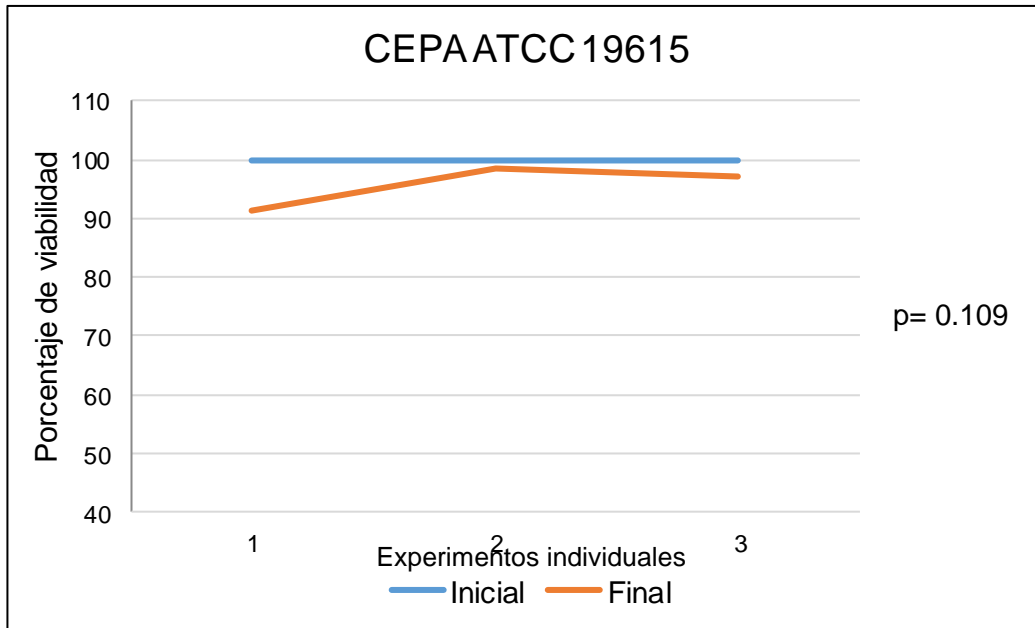


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

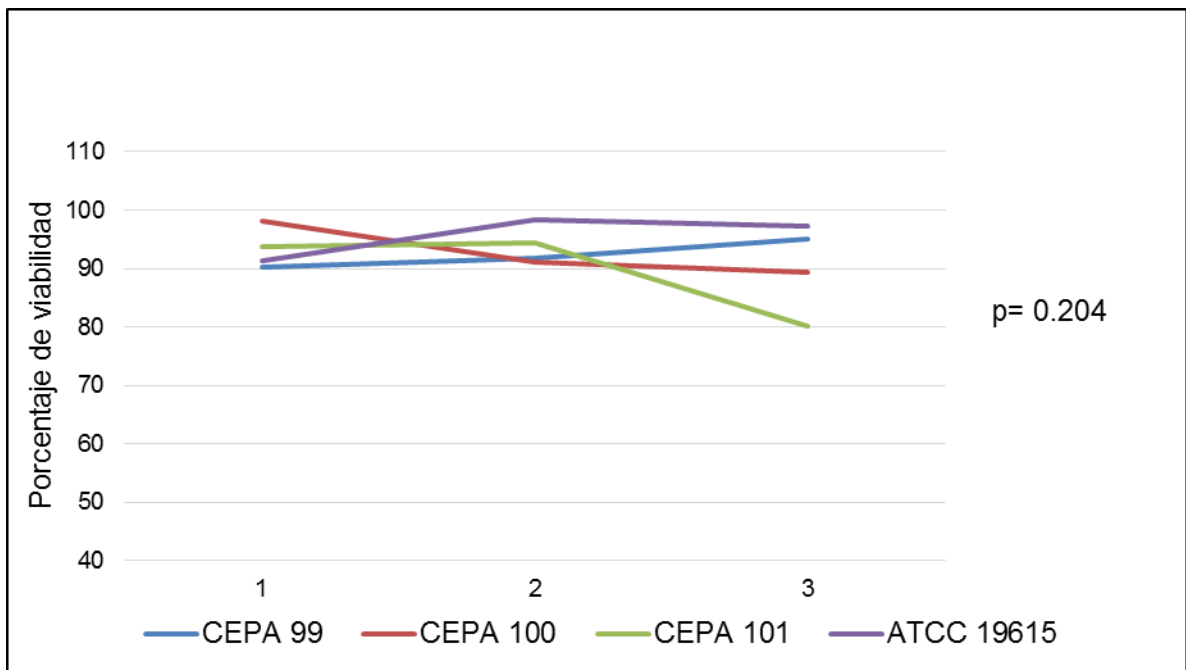


Figura 12. Comparación de las cepas de *Streptococcus pyogenes* respecto a la cepa control.

## CONCLUSIONES

1. Se logró la liofilización de cepas de *Streptococcus pyogenes*, manteniendo una viabilidad promedio de 92% indicando con ello un buen método de preservación para esta bacteria difícil de conservar por otros métodos.
2. No hubo diferencias significativas entre las cepas y la cepa control, ni tampoco entre ellas mismas.
3. La leche descremada al 1% mostró una crioprotección satisfactoria reflejada en una sobrevivencia del 92%, 93% 89% y 95% respectivamente en las 4 cepas de *Streptococcus pyogenes* (99, 100, 101 y ATCC19615), además permite la fácil reconstitución del liófilo.



## RECOMENDACIONES

1. Extremar precauciones en el manejo de la muestra pre y post-liofilización como: esterilizar el recipiente en el cual se colocan los viales para liofilizar, trabajar en campana de seguridad, utilizar equipo de protección adecuado para la manipulación de las muestras a través de todo el proceso.
2. Congelar de manera vertical los viales para evitar derrames.
3. Evitar el descongelamiento de la muestra antes de someterse a liofilización.
4. Sellar los viales una vez concluido el proceso de liofilización para protegerlos de la humedad y almacenarlos en un lugar seco.
5. Tomar precauciones en caso de reconstituir el liófilo ya que es de fácil diseminación y se corre un mayor riesgo de contaminación del medio ambiente.
6. Evaluar periódicamente la viabilidad bacteriana tanto a corto como a largo plazo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado JD.** 1996. Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. 2ed. Radio Comunicaciones OEA, Quito, Ecuador. 9:194.
- Bashan Y.** 1998. Inoculants of Plant Growthpromoting Bacteria for Use in Agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Battistuzzi FU,** Feijao A, Hedges SB. 2004. A Genomic Timescale of Prokaryote Evolution: Insights Into the Origin of Methanogenesis, Phototrophy, and the Colonization of Land. *BMC Evol. Biol.* 4: 44.
- Bernal P,** Duque E, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Ramos JL, Segura A. 2006. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 472-477.
- Boiso I.** 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18: 127-131.
- Broadbent JR,** McMahon DJ, Moineau S, Oberg CJ, Welker DL. 2003. Biochemistry Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*: a Review. *J. Dairy Sci.* 86: 407-423.
- Cárdenas E,** Tiedje JM. 2008. New Tools for Discovering and Characterizing Microbial Diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 544-549.
- Coral A,** Mora G, Muñoz G. 2005. Evaluación del proceso de deshidratación de zapallo, Cucúrbita Máxima (Duch. ex Lam) de la variedad unapal-mandarino y mango común, Mangifera Indica L por métodos combinados (Osmoliofilización). Trabajo de grado. Universidad Nacional De Colombia, Facultad de Ingeniería Y Administración, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Sede Palmira. 27-30.
- De Leeuw, FE.,** De Leeuw AM., Den Daas HG, Colenbrader B, Werkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology.* 30: 32-44.
- De Paoli.** 2005. Biobanking in microbiology. From samble collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbilol.* 29: 8897-910.
- De Vos P,** Gillis M, Kersters K, Pot B, Swings J, Vandamme P. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiol. Revs.* 60: 407-438.
- Demain AI,** Davies JE. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2da ed. Washington, USA: ASM Press. 651-665 p.

- Ertola R**, Mignone C, Yantorno P. 1994. Microbiología Industrial. OEA. 8-9 p.
- Fellows P**. 2000. Food Processing Technology: Principles and Practice. 2da ed. Ed. CRC Press LLC.
- Fernández M**, Paredes Salido F, García Martos P. 1994. Microbiología Clínica Práctica. 2da ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz UCA. 78-79p.
- Forbes B**, Sahm D, Weissfeld A. 2009. Diagnóstico Microbiológico. 12va ed. Editorial Médica Panamericana. 265-278p.
- Fukuda L**, Itoh T, Sakane T, Yokota A. 1992. Long-Term Preservation of Halophilic Archaeobacteria and Thermoacidophilic Archeobacteria by Liquid Drying. Microbial Methods. 16: 281-287.
- García J**, Vila L. 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. Biología y Clínica Hematológica. 6: 219-225.
- García MD**, Uruburu F. 2000. La Conservación de Cepas Microbianas. SEM. 30: 12-16.
- García T**, Vila L. Revisión de los Aspectos Termodinámicos y Cinéticos Implicados en un Proceso de Criopreservación Biológica. Biol. Clín. Hematol. 5: 135-142.
- Geankoplis CJ**. 1999. Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. 3ra ed. Compañía Editorial Continental. México.
- Gillot, G**. 1969. loc. cit.; Holden y Bryant. Sep. Sci. 4: 1-13.
- Grainger JM**, Lynch JK. 1984. Microbiological methods for environmental biotechnology. London: Academic Press. 234-237.
- Grossmann M**, Santaló J. (1991). Aspectos teóricos de la congelación de gametos de embriones. Treb Soc Cat Biol. 42: 87-108.
- Gupta MN**, Roy I. 2004. Freeze-drying of Proteins: Some Emerging Concerns. Biotechnol. Appl. Biochem. 39: 165-177.
- Herman N**, Morgan CA, Vesey G, White PA. 2006. Preservation of Microorganisms by Drying; a Review. J. Microbiol. Methods. 66: 183-193.
- Hernández A**. 2003. Microbiología Industrial. EUNED. 17-18 p.
- Herrera MC**, Morales-García YE, Muñoz-Rojas J. 2007. Cloranfenicol, un Antibiótico Clásico como Alternativa en el Presente. Rev. Mex. Ciencias Farm. 38: 58-69.
- Holt, WV**. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 53: 47-58.
- Hoti SL**, Pravakaran G. 2008. Immobilization in Alginate as a Technique for the Preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* for Long-Term Preservation. J. Microbiol. Methods. 72: 91-94.

- Hubálek Z.** 2003. Protectants Used in the Cryopreservation of Microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-229.
- Jain RK,** Paul D, Pandey Gm Pandey J. 2005. Accessing Microbial Diversity for Bioremediation and Environmental Restoration. *TRENDS Biotechnol.* 23: 135-142.
- Jennings TA.** 1993. Seminario de liofilización, Sociedad Internacional de Liofilización.
- Kamilova F,** Lugtemberg B. 2009. Plantgrowth Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Kumar S,** Millar JD, Watson PF. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 46: 246-253.
- Levine H,** Slade L. 1987. Collapse Phenomena. A unifying concept for interpreting the behavior of low. Moisture foods. *Food Structure, Its creation and evaluation*. Eds. J.R. Mitchell and J.M.V Blausherd. Butterworths, London. 149-180 p.
- Liao CH,** Shollenverger LM. 2003. Survivability and Long-Term Preservation of Bacteria in Water and in Phosphatebuffered Saline. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 45-50.
- Marivel R.** 1998. Estreptococo beta hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). "REVISTA". 19: 24-51.
- Mazur P.** 1984. Freezing of living cells: mechanism and implications. *The American Journal of Physiology*. 247: 125-142.
- Medealy P,** O'Connor R. 2006. General Procedures for cell culture. Elsevier Science. 2: 13-20.
- Medeiros CM,** Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57: 327-344.
- Orrego A,** Carlos E. 2003. Apuntes del Curso Procesamiento de Alimentos: línea de profundización, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura. 291-301.
- Patel SM,** Doen T, Pikal MJ. 2010. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. *AAPS PharmSciTech*.11: 73-84.
- Perry H.** 1997. Manual del Ingeniero Químico. 6ta ed. Bogotá, Colombia. 4: 17-14.
- Perry SF.** 1995. Freeze-drying and Cryopreservation of Bacteria. *Methods Mol. Biol.* 38: 21-30.
- Pikal MJ.** 1990. Freeze-drying of proteins II. Formulation selection. *BioPharm* 3:26-30.
- Potts M.** 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58: 755-805.

- Rall WF**, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*. 313, 573-575.
- Ramírez JS**, Cañizares J. 2003. Deshidratación de la Papa Mediante Liofilización Atmosférica. Quito-Ecuador. 86-112.
- Rescott CS**. 1982. *Industrial microbiology*. 4ta ed. Westport, Connecticut: Avi Publishing. Compay Inc. 321 p.
- Romero CR**. 2007. *Microbiología y parasitología humana*. 3ra ed. Médica Panamericana S.A. de C.V. 406 p.
- Ryan MJ**, Smith D. 2007. Cryopreservation and Freeze-drying of Fungi Employing Centrifugal and Shelf Freeze-drying. In: *Methods in Molecular Biology*. 368: 127-140.
- Salamon S**, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62: 77-111.
- Simione FP**, Brown EM. 1991. *ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze Drying*. American Type Culture Collection. Rockville Maryland. 1-42p.
- Stoycheva T**, Tsvetkov T, Venkov P. 2007. Mutagenic Effect of Freezing on Mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*. 54: 243-250.
- Tomás M**, Aurora G, Herminia D. 1993. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. *Sociedad Iberoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud*. 11: 113-119.
- Uruburu F**. 2003. History and Services of Culture Collections. *Int. Microbiol.* 6: 101-103.
- Weng AZ**, Junco DA, Diaz RE, Álvarez MI. 2005. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Higiene y Epidemiología*. 43.
- Zinsser H**. 1994. *Microbiología*. 20va ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 577-579p.
- Zulia WA**, Olvido DR, Inalvis AM. 2005. Conservación de microorganismos: ¿Qué Debemos Conocer? *Hig Epidemiol.* 43:1-4.

## ANEXOS

### Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CEPA99DL - CEPA99AL	Negative Ranks	3 <sup>a</sup>	2.00	6.00
	Positive Ranks	0 <sup>b</sup>	.00	.00
	Ties	0 <sup>c</sup>		
	Total	3		
CEPA100DL - CEPA100AL	Negative Ranks	3 <sup>d</sup>	2.00	6.00
	Positive Ranks	0 <sup>e</sup>	.00	.00
	Ties	0 <sup>f</sup>		
	Total	3		
CEPA101DL - CEPA101AL	Negative Ranks	3 <sup>g</sup>	2.00	6.00
	Positive Ranks	0 <sup>h</sup>	.00	.00
	Ties	0 <sup>i</sup>		
	Total	3		
ATCCDL - ATCCAL	Negative Ranks	3 <sup>j</sup>	2.00	6.00
	Positive Ranks	0 <sup>k</sup>	.00	.00
	Ties	0 <sup>l</sup>		
	Total	3		

a. CEPA99DL < CEPA99AL

b. CEPA99DL > CEPA99AL

c. CEPA99DL = CEPA99AL

d. CEPA100DL < CEPA100AL

e. CEPA100DL > CEPA100AL

f. CEPA100DL = CEPA100AL

g. CEPA101DL < CEPA101AL

h. CEPA101DL > CEPA101AL

i. CEPA101DL = CEPA101AL

j. ATCCDL < ATCCAL

k. ATCCDL > ATCCAL

l. ATCCDL = ATCCAL

### Test Statistics<sup>b</sup>

	CEPA99DL - CEPA99AL	CEPA100DL - CEPA100AL	CEPA101DL - CEPA101AL	ATCCDL - ATCCAL
Z	-1.604 <sup>a</sup>	-1.604 <sup>a</sup>	-1.604 <sup>a</sup>	-1.604 <sup>a</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.109	.109	.109

a. Based on positive ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Estadística Wilcoxon

### Ranks

	VAR00007	N	Mean Rank
VAR00006	1.00	3	5.33
	2.00	3	4.00
	3.00	3	10.00
	4.00	3	6.67
	Total	12	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	VAR00006
Chi-Square	4.590
df	3
Asymp. Sig.	.204

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: VAR00007

Estadística Kruskal Wallis