

Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia

Conservation of bacteria by freeze-drying in the Microorganisms Collection CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia

María P. Quintero-Rodríguez ^a, Daniela Montoya-Arango ^a
Deisy C. Restrepo-Posada ^a, Diana M. González-Gil  ^{ab}

^a Grupo de investigación Microbiología Básica y Aplicada, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Colombia

^b Colección de Microorganismos, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Colombia

Recibido: 16 de diciembre, 2022

Aceptado: 2 de marzo, 2023

Publicado en línea: 1° de julio, 2023

Citación del artículo: Quintero-Rodríguez, M. P., Montoya-Arango, D., Restrepo-Posada, D. C., y González-Gil, D. M. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota Colombiana*, 24(2), e1127.

<https://doi.org/10.21068/2539200X.1127>



Resumen

Las colecciones microbianas preservan cepas *ex situ* con el propósito de mantener los microorganismos viables, puros y estables en el tiempo. Para esto se recomienda preservar idealmente por criopreservación y liofilización. Actualmente, la Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia (CM-EM-UDEA) preserva bacterias únicamente por criopreservación y requiere estandarizar la liofilización para que posibilite la viabilidad de los microorganismos por un mayor tiempo, optimice el almacenamiento y facilite el transporte manteniendo estables sus características. El objetivo fue evaluar el proceso de liofilización en diferentes bacterias de la CM-EM-UDEA. Se seleccionaron seis bacterias, se estandarizaron los inóculos y se usaron diferentes lioprotectores, evaluando la eficiencia de liofilización mediante viabilidad, pureza y estabilidad de cada microorganismo antes y después de liofilizar. En la mayoría de microorganismos el lioprotector que presentó mejores resultados de viabilidad y características físicas del producto seco fue la sacarosa, sin embargo, la efectividad observada en los otros lioprotectores frente a microorganismos específicos los convierte en una alternativa de uso de acuerdo a su disponibilidad. Este estudio permitió estandarizar el proceso de liofilización manteniendo 100 % de pureza, viabilidad y estabilidad en altos porcentajes, en la mayoría de los microorganismos evaluados.

Palabras clave: bacterias, conservación, colecciones microbianas, liofilización, preservación.

Abstract

Microbial collections preserve strains *ex situ* with the purpose of maintaining viable, pure and stable microorganisms over time. For this purpose, it is recommended ideally to preserve by cryopreservation and freeze-drying. Currently, the Collection of the Escuela de Microbiología at the Universidad de Antioquia (CM-EM-UDEA) preserves bacteria only by cryopreservation and requires standardization of freeze-drying to maintain the viability of microorganisms for a long time, to optimize storage and to facilitate transport while maintaining their stable characteristics. The aim was to evaluate the freeze-drying process in different bacteria from the CM-EM-UDEA Microorganisms Collection. Six bacteria were selected, the inocula were standardized and different lyoprotectants were evaluated, assessing the freeze-drying efficiency through viability, purity and stability of each microorganism before and after freeze-drying. In most of the microorganisms, the lyoprotectant that presented the best results in viability and physical characteristics of the dry product was sucrose. However, effects observed in the other lyoprotectants in specific microorganisms make them an alternative for use according to their availability. This study enabled standardizing the lyophilization process maintaining 100% purity and viability and stability in high percentages, in most of the microorganisms evaluated.

Keywords: bacteria, conservation, microbial collections, freeze-drying, preservation.

Introducción

Las colecciones microbianas constituyen una base fundamental para el estudio de microorganismos y la conservación de la biodiversidad, preservándolos mediante la manipulación de cepas viables *ex situ*. El creciente reconocimiento de las colecciones microbianas y los servicios que ofrecen como reservorio de cepas y soporte de actividades educativas y de investigación, ha generado interés en incentivar la creación de nuevas colecciones y mejorar sus estándares de calidad (González et al., 2013), finalidad que contribuye a cumplir objetivos institucionales, nacionales y mundiales relacionados con la gestión del ambiente y la biodiversidad, así como la gestión de la ciencia, tecnología e innovación (Universidad de Antioquia [UdeA], 2018 y Escuela de Microbiología, 2021).

Las colecciones microbianas deben estar conformadas por microorganismos auténticos y la información asociada debe ser válida y suficiente para permitir la confirmación de su identidad, facilitar su uso y satisfacer las necesidades del usuario (Ávila et al., 2015; González et al., 2013). Además, para garantizar la preservación adecuada se hace necesario la implementación de métodos que reduzcan su actividad metabólica y minimicen el daño celular que puede ser causado, con el fin de asegurar la viabilidad, pureza y estabilidad genética (Grauer et al., 2015). La Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por su sigla en inglés) (World Federation for Culture Collections [WFCC], 2010), recomienda utilizar por lo menos dos métodos de preservación diferentes y sugiere que al menos uno de estos sea aquel que asegure mayor estabilidad genética y promueva viabilidad por un tiempo más prolongado como la liofilización o criopreservación en ultra frío.

Actualmente, la CM-EM-UDEA conserva por criopreservación a -80 °C especies bacterianas, método que presenta diferentes limitaciones (Grauer et al., 2015), debido a que es dependiente de la temperatura, está

directamente relacionado con el buen funcionamiento del equipo y el transporte de las especímenes es crítico por la dificultad para mantener las bajas temperaturas durante los trayectos, obligando a transportarlas en medios de cultivo que implican costos adicionales, mayor espacio de almacenamiento en refrigeración y mayores riesgos de bioseguridad por la manipulación de microorganismos metabólicamente activos. Otra limitación es la necesidad de congelar numerosas alícuotas de la misma cepa para evaluación periódica de viabilidad, estabilidad, pureza y para responder a las necesidades de docencia, investigación y extensión, dado que una vez se descongela un microorganismo no es recomendable volverlo a congelar por el riesgo de disminuir su viabilidad, provocar alguna contaminación e incluso poder afectar su estabilidad genética (Kwon et al., 2018; Mihoub et al., 2003; Ray et al., 1973; Sleight et al., 2006). Esta práctica reduce la disponibilidad de espacio para ultracongelación de nuevas cepas y aumenta costos; en este sentido, se hace necesario implementar la liofilización como método de elección para conservar los microorganismos de la CM-EM-UDEA.

La liofilización es un método que ha tenido muchas aplicaciones a lo largo de los años, es una metodología útil para aplicar a productos termolábiles o inestables en soluciones acuosas durante largos periodos de tiempo y se ha establecido como un procedimiento para superar inestabilidades físicas y químicas (Kasper et al., 2013). Actualmente, es un método que se usa con gran frecuencia para la preservación y almacenamiento de muestras biológicas, porque aúna los dos métodos más fiables de la conservación, congelación y deshidratación (Grauer et al., 2015; WFCC, 2010). Este procedimiento detiene el metabolismo celular mediante la combinación de tres fases continuas. En la primera, la muestra es congelada, en la segunda, el hielo formado se elimina en forma de vapor, proceso conocido como sublimación, que solo es llevado a cabo si la temperatura y presión parcial del vapor de agua son inferiores a la del punto triple del agua, finalmente,

hay una fase de secado para eliminar el agua adicional que no se evaporizó en el paso anterior (Assegehegn et al., 2019). El proceso puede lesionar la membrana celular por la formación de cristales y por esto es fundamental el uso de lioprotectores, sustancias que tienen diferentes funciones como mejorar la apariencia del producto final, regular la deshidratación, conferir resistencia a todos los tejidos de la célula y asegurar la estabilidad química, bioquímica y biológica durante el congelamiento y liofilización (Ávila et al., 2015; Bellali et al., 2020; Sánchez et al., 2005).

Para asegurar altas tasas de supervivencia celular es necesario realizar una buena formulación que optimice la eficiencia del proceso, mediante la adecuada combinación de lioprotectores, concentración celular, temperatura y presión de vacío para obtener un producto seco con las características deseadas (Grauer et al., 2015; Haiping et al., 2019; Yang et al., 2022). Por lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el proceso de liofilización utilizando diferentes sustancias lioprotectoras y modelos bacterianos para usar como método de preservación en la CM-EM-UDEA.

Materiales y métodos

Microorganismos evaluados. Se evaluaron diferentes modelos bacterianos buscando representatividad microbiana, partiendo de las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; y un aislado clínico de la CM-EM-UDEA: *Listeria monocytogenes*.

Activación de microorganismos. Todas las bacterias se activaron metabólicamente realizando doble repique en un medio rico a partir del método de conservación. Para el primer repique se utilizó agar sangre Columbia con 5 % de sangre de cordero, excepto para *H. influenzae* el cual se aisló en agar chocolate con PolyviteX (BioMérieux, Río de Janeiro, Brasil); el segundo repique se realizó en agar infusión cerebro corazón (siglas en inglés BHI) (Merck, Bogotá, Colombia), agar sangre o agar chocolate de acuerdo con los requerimientos nutricionales de cada modelo; se incubaron a 37 °C durante 24 h y algunas de ellas en atmósfera de CO₂ al 5 % (*L. monocytogenes*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*).

Lioprotectores. Se evaluaron tres agentes lioprotectores con algunas combinaciones. La composición evaluada en % (p.v⁻¹) fue leche descremada 10 % (Millipore, Estados Unidos), glucosa 10 % (Fisher, Estados Unidos), sacarosa 10 % (Fisher, Estados Unidos), leche descremada con glucosa 10 %, leche descremada con sacarosa 10 %.

Estandarización del inóculo. Para identificar la fase de crecimiento exponencial tardía de cada microorganismo se

realizó una curva de crecimiento en el equipo Multiskan GO (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). En un plato Corning U-bottom se dispuso por duplicado 200 ul de una dilución 1:10 a partir de un patrón 1 McFarland en caldo BHI; para *H. influenzae* el caldo se suplementó con Vitox supplement (Oxiod, EE. UU.). El equipo se programó a 37 °C, en agitación constante y se realizaron lecturas a 600 nm cada 30 minutos durante 24 h. Simultáneamente a la curva de crecimiento, cada microorganismo se puso a crecer en caldo BHI, partiendo de un patrón 1 McFarland diluido 1:10 en un volumen final de 110 ml, en agitación constante a 37 °C, durante el tiempo necesario hasta que el microorganismo alcanzara su fase exponencial tardía detectada en el equipo. Una vez alcanzada la fase exponencial tardía, se distribuyó el volumen total en 6 tubos Falcon y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 minutos. Después de precipitar la biomasa se retiró el sobrenadante y se reconstituyó cada botón celular con 4 ml de un lioprotector específico y nuevamente se distribuyeron en dos tubos para liofilizar con capacidad de 3 ml resistentes al vacío, cada uno con 2 ml de suspensión; la biomasa del sexto tubo se reconstituyó con 2 ml de caldo BHI con el fin de comparar el efecto de la liofilización en la viabilidad y estabilidad de los microorganismos sin adición de lioprotectores. Adicionalmente, se preparó un tubo con 2 ml de cada lioprotector sin microorganismos como control negativo. Finalmente, todos los tubos fueron ultracongelados durante 24 h a -80 °C para realizar al día siguiente la liofilización.

Liofilización. La liofilización se llevó a cabo en un liofilizador Labconco Freezone plus 2.5 (Marshall Scientific, Hampton, USA), programado a -80 °C, a una presión de 6 pascales (6 Pa), durante 24 h.

Reconstitución de los liofilizados. Inmediatamente después de liofilizar se reconstituyó uno de los tubos de cada lioprotector y el tubo sin lioprotector con 2 ml de caldo BHI. Los duplicados se almacenaron a 4 °C, para futuros ensayos

Evaluación de viabilidad. Previo a la liofilización y a partir del sexto tubo resuspendido solo con caldo BHI, se tomaron 10 ul de cada microorganismo y se distribuyeron de forma homogénea sobre la caja de agar para el conteo de colonias; *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* en agar BHI; *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae* en agar sangre y *H. influenzae* en agar chocolate, a 37 °C durante 24 h, los tres últimos en atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, se calcularon las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC.ml⁻¹) por medio de la fórmula: $(UFC.ml^{-1}) = (UFC \text{ por placa}) \cdot ((\text{factor de dilución})(\text{volumen sembrado}))^{-1}$ (Ávila et al., 2015). Inmediatamente después de liofilizar, se reconstituyeron los microorganismos como se indicó previamente y se sembraron 10 ul de cada uno de forma cuantitativa en los medios de cultivo mencionados, durante 24 h a 37 °C. Tras el periodo de incubación se hizo el cálculo de UFC.ml⁻¹ para cada uno con la fórmula descrita

previamente y se calculó el porcentaje de viabilidad para cada microorganismo en cada lioprotector con el fin de determinar aquellos que tuvieran una viabilidad mayor al 70 % según la fórmula de Ávila et al. (2015): porcentaje de viabilidad = $(Xf \cdot Xi^{-1}) \cdot 100$, donde Xi corresponde al número de UFC.ml⁻¹ antes de liofilizar y Xf corresponde al número de UFC.ml⁻¹ después de liofilizar.

Evaluación de la estabilidad. Se realizaron pruebas convencionales específicas para cada especie, partiendo de los medios de cultivo para recuento de UFC/ml antes y después de liofilizar.

Resultados

El tiempo para alcanzar la fase exponencial tardía necesaria para el inóculo inicial de la liofilización estuvo entre cuatro y diez horas, siendo *E. coli* quien requirió menos tiempo de incubación, mientras *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* tardaron diez horas para alcanzar esta fase (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempo en horas para la fase de crecimiento exponencial tardía de las bacterias.

Microorganismo	Tiempo para alcanzar la fase exponencial tardía (horas)
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10

Después de realizar el proceso de liofilización, se evaluó el aspecto físico del producto seco, observándose una estructura de consistencia definida en todos los lioprotectores a excepción de la glucosa que presentó una apariencia espumosa que no cumplió con las características esperadas. En la mayoría de los microorganismos se mantuvieron estables las características evaluadas y el lioprotector que mejor rendimiento tuvo fue la sacarosa 10 %; llama la atención que se obtuvo viabilidad en algunos microorganismos liofilizados solo con medio de cultivo sin lioprotector. No se obtuvo ningún tipo de crecimiento en los controles negativos evidenciando la pureza del proceso.

En cuanto a la estabilidad de las bacterias Gram negativas (Tabla 2), se observó que en *E. coli* las pruebas y la morfología macro y microscópica se mantuvieron iguales antes y después del proceso de liofilización. Por su parte, *P. aeruginosa* presentó cambios macroscópicos, observándose colonias con un pigmento verde en todos los lioprotectores después de liofilizar; todas las demás pruebas y características microscópicas permanecieron estables. En contraste, *H. influenzae* tuvo cambios en la morfología microscópica de la muestra liofilizada con leche

descremada, los cocobacilos eran más pequeños que antes de ser liofilizados, mientras que las demás características fueron similares.

Con las bacterias Gram positivas (Tabla 3) también se observaron algunas modificaciones. Todas las pruebas realizadas para *L. monocytogenes* se mantuvieron estables, no obstante, se presentaron cambios en la morfología macroscópica y microscópica, antes de liofilizar se observaron colonias de tamaño pequeño y bacilos Gram positivos medianos, luego de liofilizar se recuperaron colonias puntiformes y bacilos Gram positivos cortos. Por su parte, *S. pneumoniae* luego de liofilizar, presentó colonias alfa hemolíticas y puntiformes con leche descremada, mientras que con los lioprotectores leche descremada con sacarosa, leche descremada con glucosa y caldo BHI, eran colonias alfa hemolíticas de tamaño medio y borde definido, conservando las características de las colonias antes de ser liofilizadas; no se observaron cambios en las demás características evaluadas, sin embargo, en los lioprotectores glucosa y sacarosa no se realizaron pruebas por la ausencia de crecimiento. En *S. aureus* no se observó ningún cambio en las características evaluadas antes y después de liofilizar en ninguno de los lioprotectores, ni en el caldo BHI. La Tabla 2 y la Tabla 3 muestran los resultados detallados de las pruebas realizadas a cada una de las bacterias con los diferentes lioprotectores evaluados y el control en caldo BHI. El resultado descrito después de liofilizar corresponde a los hallazgos que fueron iguales en todos los lioprotectores; solo se mencionan lioprotectores individuales en caso de que el cambio obedezca a un lioprotector en específico.

Al evaluar la viabilidad (Figura 1), se evidenció que en la mayoría de las bacterias se obtuvo un porcentaje cercano al 100 % con sacarosa como lioprotector, sin embargo, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* no crecieron con esta sustancia protectora. De hecho *S. pneumoniae* (naranja) tuvo viabilidad menor al 1 % y *H. influenzae* (azul claro) menor al 30% con otros lioprotectores. Todos los lioprotectores tuvieron una excelente viabilidad para *L. monocytogenes* (rojo), aunque cuando se usó leche descremada la viabilidad fue del 50 %. Para *S. aureus* (amarillo) la viabilidad en sacarosa y glucosa fue del 100 % pero en los demás lioprotectores estuvo por debajo del 40 %, aunque llama la atención que cuando se usó solo el caldo de cultivo para liofilizar la viabilidad superó el 70 %, hallazgo similar fue observado en *P. aeruginosa* (verde) en la cual se obtuvo viabilidad mayor al 70 % en los lioprotectores sacarosa, leche descremada con sacarosa, leche descremada con glucosa y del 60 % en caldo de cultivo solo, parecido a la viabilidad con glucosa. En contraste, el porcentaje esperado para *E. coli* (azul oscuro) solo se obtuvo con sacarosa, en los demás lioprotectores fue alrededor del 60 %. En general, el peor desempeño se observó con leche descremada, en el cual la viabilidad fue muy baja o no se obtuvo ningún crecimiento después de liofilizar.

Tabla 2. Resultado de pruebas en bacterias Gram negativas antes y después de liofilizar.

Microorganismo	Prueba	Antes de liofilizar	Después de liofilizar
<i>Escherichia coli</i>	Gram	BGN largos	BGN largos
	Oxidasa	-	-
	Citrato	-	-
	Urea	-	-
	Lisina	K/K	K/K
	TSI	A/A con gas	A/A con gas
	SIM	Movilidad + Indol + Ácido sulfhídrico -	Movilidad + Indol + Ácido sulfhídrico -
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gram	CBGN	CBGN CBGN menor tamaño que antes de liofilizar (leche descremada)
	Oxidasa	+	+
	Catalasa	+	+
	Prueba de factores	Crecimiento en X+V	Crecimiento en X+V
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram	BGN largos	BGN largos
	Oxidasa	+	+
	OF glucosa	Oxidación (+) Fermentación (-)	Oxidación (+) Fermentación (-)
	TSI	K/K	K/K

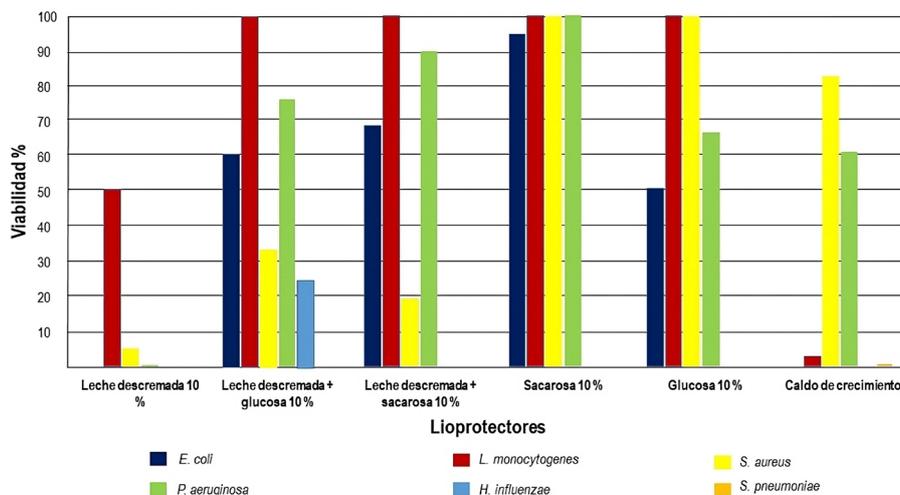
- (negativo), + (positivo), A (ácido), BGN (bacilos Gram negativos), CBGN (coco bacilos Gram negativo), K (alcalino), TSI (Triple Sugar Iron Agar), V (nicotinamida adenina dinucleótido), X (protoporfirina).

Tabla 3. Resultado de pruebas en bacterias Gram positivas antes y después de liofilizar.

Microorganismo	Prueba	Antes de liofilizar	Después de liofilizar
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram	BGP largos	BGP cortos
	Urea	-	-
	Glucosa	+	+
	Xilosa	+	+
	Manitol	-	-
	Maltosa	+	+
	CAMP	+	+
	Bilis esculina	+	+
	Movilidad a 25 °C	+	+
	Movilidad a 37 °C	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram	CGP racimos	CGP racimos
	Catalasa	+	+
	Coagulasa	+	+
	Fermentación de manitol	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gram	CGP pares o cadenas	CGP pares o cadenas NC en glucosa, sacarosa
	Catalasa	-	-
	Optoquina	Sensible	Sensible
	Solubilidad bilis 10 %	+	+

- (negativo), + (positivo), A (ácido), BGN (bacilos Gram negativos), CBGN (coco bacilos Gram negativo), K (alcalino), TSI (Triple Sugar Iron Agar), V (nicotinamida adenina dinucleótido), X (protoporfirina).

Figura 1. Porcentaje de viabilidad de bacterias después de liofilizar.



Discusión

Este estudio detalla información encontrada durante la estandarización del proceso de liofilización en bacterias, aportando evidencia científica sobre los efectos de dicho proceso, no solo en la viabilidad de los microorganismos, sino también sobre su estabilidad y pureza, lo cual resulta significativo puesto que la mayoría de estudios solo hacen referencia a la viabilidad, incluso solo de manera cualitativa. Un ejemplo de esto es el estudio de Cleland et al. (2004) quienes realizaron ensayos con diferentes sustancias protectoras y métodos de preservación de bacterias como *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *H. pylori*, diferentes especies de *Acidithiobacillus* spp, entre otras de importancia clínica y ambiental, cuantificando la viabilidad tras liofilizar y 7 días después, sin evaluar otras características de las cepas. Siberry et al. (2001), evaluaron diferentes métodos de preservación de *S. pneumoniae*, reportando solo viabilidad en diferentes periodos después de preservar; Miyamoto et al. (2000), hicieron seguimiento de viabilidad tras liofilizar a *Saccaromyces cerevisiae*, *S. mutans*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. putida* y otras bacterias, aunque se reportaron resultados de hasta 15 años, no incluyeron otros criterios para evaluar estos microorganismos a través del tiempo; así mismo, Moreira et al. (1995), realizaron un ensayo evaluando solo viabilidad de *N. meningitidis* después de liofilizar con diferentes lioprotectores y a diferentes temperaturas de almacenamiento. Aunque también se han publicado ensayos de liofilización que reportan otras evaluaciones, como pureza, integridad celular y actividad enzimática después de liofilizar (Wang et al., 2020), son menos frecuentes. En general, los estudios mencionados tienen protocolos de liofilización similar en cuanto a temperatura de liofilización menor a -50 °C durante 15 a 20 h y presión de vacío menor a 20 Pa, pero existe alta variabilidad en cuanto a lioprotectores

usados, métodos y tiempo de congelación previo a la liofilización.

Los microorganismos evaluados en este estudio fueron elegidos como modelos representativos de diferentes grupos específicos con el fin de extrapolar los resultados a otros con características y requerimientos nutricionales similares, ampliando el alcance de los resultados y conclusiones. Dentro de las bacterias Gram negativas, se evaluó *E. coli* como representante de enterobacterias, *P. aeruginosa* como bacilo Gram negativo no fermentador de glucosa y *H. influenzae* como parte de los agentes de difícil crecimiento; de los Gram positivos, *Listeria* spp. como bacilo Gram positivo, *S. aureus* como coco Gram positivo catalasa positivo y *S. pneumoniae* como coco Gram positivo catalasa negativo de difícil crecimiento. Para la liofilización de los microorganismos, se evaluaron tres lioprotectores con algunas combinaciones, elegidos por la disponibilidad en el laboratorio, su uso frecuente como lioprotectores y por su relación costo/efectividad (Hubálek, 2003). La leche descremada es un lioprotector no permeable ampliamente utilizado para la preservación por liofilización de células eucariotas pues facilita el proceso al contener lactosa, caseína y albúmina que se absorben en la superficie del microorganismo formando un tipo de capa viscosa para inhibir la formación de cristales y mantener una estructura amorfa de estos, sin embargo, en este estudio no se obtuvieron porcentajes de viabilidad mayores al 60 %, resultados que concuerdan con publicaciones previas pese a que en la literatura científica es uno de los lioprotectores más recomendados (Grauer et al., 2015; Guo et al., 2020; Stefanello et al., 2019). Moreira et al. (1995) reportaron una viabilidad del 34,8 % cuando liofilizaron una cepa de *Neisseria meningitidis* con leche descremada al 10 % como lioprotector, mientras Cheng et al. (2022) reportaron viabilidad de 37,4 % y 46,6 % para *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, respectivamente, con el mismo

lioprotector, demostrando su baja efectividad cuando se usa en la liofilización microbiana. Por otro lado, se observó que la leche descremada en combinación con glucosa y sacarosa presenta mejores resultados que cuando se utilizó solo leche descremada al 10 %, pero dicha combinación reduce el porcentaje de viabilidad comparado con el uso de dichos azúcares como lioprotectores individuales. En estudios publicados previamente reportaron resultados similares con diferentes microorganismos, sugiriendo que la leche descremada puede afectar negativamente la viabilidad (Ávila et al., 2015; Lago, 2014).

Los carbohidratos como lioprotectores regulan la deshidratación, al aumentar la viscosidad al interior de las células, mejoran la resistencia a bajas temperaturas y presiones, además, sustituyen el agua de la célula a través de la formación de puentes de hidrógeno lo que confiere estabilidad a las proteínas de membrana (Moreira et al., 1994). Muchos azúcares han sido usados como lioprotectores, siendo trehalosa, maltosa, sacarosa y glucosa los más recomendados en la literatura, no obstante, disacáridos como sacarosa o trehalosa, tienen un mayor efecto sobre las propiedades de vitrificación, dado que al ser compuestos semipermeables penetran la pared celular, pero no la membrana citoplasmática, induciendo a una plasmólisis celular antes de congelar, previniendo la formación de cristales de hielo y brindando una protección mecánica a la célula (Grauer et al., 2015). En comparación con lioprotectores monosacáridos como glucosa o fructosa (Bejarano et al., 2017), en nuestro ensayo, la sacarosa 10 % presentó muy buenos resultados en la mayoría de las bacterias, superando el 70 % de viabilidad y alcanzando el 100 % de estabilidad y pureza. Todos los microorganismos se aislaron 100 % puros y con un alto grado de estabilidad, por lo tanto, la sacarosa se convierte en un lioprotector promisorio para elegir en nuestra colección, máxime la comparativa costo-efectividad que tiene frente a la trehalosa en la actualidad.

Respecto a la glucosa, aunque no se halló ningún cambio en las características morfológicas antes y después de liofilizar, sería importante que futuros estudios evalúen su uso en concentraciones menores al 10 %, además de las características físicas e higroscópicas durante el almacenamiento para determinar el efecto en la viabilidad, estabilidad y pureza de los microorganismos en el tiempo. Por otro lado, llamó la atención que el caldo BHI, usado como control para evaluar el efecto de la liofilización sobre microorganismos sin agente lioprotector, conservó adecuadamente la viabilidad de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con resultados mayores al 60 y 70 % respectivamente y sin cambios fenotípicos significativos. Estos resultados podrían explicarse por la composición de dicho medio de cultivo, puesto que es rico en glucosa, peptonas, vitaminas y aminoácidos, componentes que usualmente se usan como lioprotectores solos o combinados con otras sustancias, evidenciando el potencial uso de este caldo de

cultivo como lioprotector, teniendo en cuenta su relación costo-beneficio, amplia disponibilidad en los laboratorios y fácil preparación (Balows et al., 1991).

Si bien no se evidenciaron cambios en la estabilidad después de liofilizar *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, tampoco se obtuvieron resultados de viabilidad mayores al 70 %. Comparativamente, autores como Cleland et al. (2004) reportaron viabilidad del 86 % para *S. pneumoniae* durante un periodo de 20 años cuando se usó glicina betaína como lioprotector, mientras Siberry et al. (2001), obtuvieron 75 % de viabilidad durante 1 año y 4 meses cuando liofilizaron *S. pneumoniae* con leche descremada. En el caso de *H. influenzae*, si bien se reportó una viabilidad de 100 % por un periodo de 4 años usando glucosa, leche descremada, carbón activado, ascorbato de sodio y gelatina, fue una mezcla empleada para conservar microorganismos por desecación y no por liofilización (Obara et al., 1981). Aunque los estudios mencionados anteriormente han demostrado buenos resultados de viabilidad para *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, en este estudio se incluyeron sustancias protectoras fácilmente asequibles, disponibles en nuestro laboratorio y con una alta relación costo beneficio. Dados los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que la fase de crecimiento exponencial tardía de *H. influenzae* se alcanzó antes del tiempo esperado según sus características fisiológicas y a lo reportado en otros estudios (Hernández et al., 2007), se hace necesario realizar nuevas investigaciones que evalúen las condiciones de liofilización óptimas en estas bacterias, puesto que sus requerimientos nutricionales, de crecimiento y la concentración del inóculo inicial pueden requerir condiciones especiales para incorporar en el protocolo de conservación.

Durante el establecimiento de las condiciones óptimas de liofilización, se utilizó una densidad celular de 3×10^8 células.ml⁻¹ correspondiente a la escala 1 McFarland (Gómez et al., 2017). Se evaluaron también las curvas de crecimiento de cada microorganismo con el fin de identificar la fase exponencial tardía. Clásicamente se han descrito 4 fases, en la primera o de latencia, inicia un ajuste del metabolismo como adaptación a un nuevo medio; en la segunda o de crecimiento exponencial, hay una multiplicación y consumo de nutrientes máxima; en la tercera o estacionaria, hay reducción de la velocidad de crecimiento, dado por agotamiento de nutrientes, acumulación de metabolitos tóxicos o alta densidad microbiana; la transición entre estas dos últimas fases es conocida como fase exponencial tardía o estacionaria temprana; en la cuarta fase o de muerte, se reduce la población bacteriana, generalmente por agotamiento de las reservas energéticas (Kolter, 1993; Rodríguez et al., 2016). Se ha observado que la fase de crecimiento tiene un impacto importante en la fisiología bacteriana y respuesta al medio, así, las diferentes fuentes de estrés condicionan en los microorganismos cambios fisiológicas que les confieren mayor resistencia, inclusive frente a otros

estresantes, como mecanismos de protección cruzada. En este sentido, la fase de crecimiento exponencial tardía representa un ambiente de estrés que induce diferentes respuestas de supervivencia celular, logrando mayores tasas de viabilidad en la liofilización (Rangel, 2015; Rodríguez et al., 2016).

Si bien se encontraron algunos cambios en las características evaluadas en las bacterias, es importante tener en cuenta que no solo el proceso de liofilización puede generar cambios en la morfología y generar impactos en los microorganismos, también existen múltiples factores como el choque térmico, estrés oxidativo, congelación intracelular y el daño celular durante el recalentamiento que pueden generar cambios en los genotipos y fenotipos microbianos. En la literatura se han reportado mecanismos relacionados al choque térmico y a procesos de congelación y descongelación, sin embargo, no se han estudiado estos daños en paralelo con los que pueden sufrir las células durante la etapa de secado o sublimación, por lo cual es necesario profundizar sobre los mecanismos de daño generados específicamente en la liofilización (Gao et al., 2000; Guo et al., 2020; Hubálek, 2003).

Es importante tener en cuenta que, aunque la sacarosa mostró tener muy buenos resultados de viabilidad, estabilidad y pureza sería importante evaluar el efecto que tiene el almacenamiento a largo plazo en la estabilidad del producto seco, con este y otros lioprotectores. Además, solo se evaluaron características fenotípicas en los microorganismos, la evaluación de estabilidad genética mediante métodos moleculares como secuenciación genómica o proteómica, permitiría entender con mayor claridad los cambios que se presentaron con el proceso.

Conclusiones

La liofilización como método de conservación permite mantener estabilidad, pureza y altos porcentajes de viabilidad cuando se usa un lioprotector adecuado; en este caso fue la sacarosa la que mejor preservó las características metabólicas, fisiológicas y morfológicas con porcentajes de viabilidad mayores al 70 % en las bacterias evaluadas. En *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, aumentar la concentración inicial y evaluar otros lioprotectores podría mejorar la viabilidad post-lioilización.

Las condiciones óptimas de liofilización se lograron con una temperatura de -80 °C, presión de 6 Pa, densidad celular inicial aproximada de 3×10^8 UFC.ml⁻¹, y tiempo de liofilización de 24 h. Sería importante realizar nuevos estudios que evalúen otras concentraciones de glucosa y su impacto en la viabilidad, estabilidad y pureza en el almacenamiento a largo plazo; además, estudiar el posible uso de caldos de cultivo como lioprotectores, dada su relación costo/beneficio y mayor disponibilidad en los laboratorios.

Referencias

- Assegehegn, G., Brito de la Fuente, E., Franco, J. M., y Gallegos, C. (2019). The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378-1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
- Ávila, L., Naranjo, J., y Higuaita, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10, 7-13. http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector10_2.pdf
- Balows, A., Hausler, J. W., Herrmann, K. L., y Isenberg, H. D. (1991). Manual of Clinical Microbiology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33, 434-434. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000600014>
- Bejarano, A. F., Erazo, L. E., Luengas, Y., y Álvarez, O. A. (2017). Estudio del efecto de un agente crioprotector en la liofilización de una emulsión directa O/W [Trabajo de grado, Universidad de los Andes] <https://doi.org/10.51566/catalogos2118>
- Bellali, S., Bou, J., Fontanini, A., Raoulta, D., y Lagiera, C. (2020). A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, 236, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>
- Cheng, Z., Yan, X., Wu, J., Weng, P., y Wu, Z. (2022). Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2. *Cryobiology*, 105, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.01.003>
- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., y Emerson, D. (2004). Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 58(1), 31-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.015>
- Escuela de Microbiología. (2021). *Plan de Acción de la Escuela de Microbiología 2021-2024*. Universidad de Antioquia.
- Gao, D., y Critser, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187-96. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Gómez, J. N., Pérez, S. O., y López, L. B. (2017). Estandarización de un método para la conservación de cepas del laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira [Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://repositorio.utp.edu.co/items/94d8bf93-48ee-450c-b36c-de214b550c1e>

- González, D. M., y Jiménez, J. N. (2013). Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*, 4(1), 23-33. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/20093/16974>
- Grauer, A., Grunberg, K., y Zardo, S. (2015). *Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos* [Trabajo de grado, Universidad ORT Uruguay]. <http://hdl.handle.net/20.500.11968/3172>
- Guo, N., Wei, Q., y Xu, Y. (2020). Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>
- Haiping, L., Pei, Z., Shuhai, Z., Dengyun, Z., Herong, F., Yi, S., y Xinqian, W. (2019). Protective effect of polysaccharides from *Pholiota nameko* on *Lactobacillus casei* ATCC 334 subjected to freeze-drying. *LWT*, 115, 108463. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108463>
- Hernández, J., Blanco, O. C., Cuello, M., Martínez, L. R., y Coronel, A. T. (2007). Mal de las vacas locas: su influencia en la obtención del antígeno principal de *Haemophilus influenzae* tipo b. *Revista CENIC*, 38(1), 70-74.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Kasper, J. C., Winter, G., y Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>
- Kolter, R., Siegele, D. A., y Torno, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology*, 47, 855-874. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.004231>
- Kwon, Y., Bae, J., Kim, S., y Han, N. (2018). Development of Freeze-Thaw Tolerant *Lactobacillus rhamnosus* GG by Adaptive Laboratory Evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02781>
- Lago, N. B. (2014). Evaluación del cultivo liofilizado de *Candida albicans* utilizado en esquemas de certificaciones de calidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 321-329. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig05314.pdf>
- Mihoub, F., Mistou, M., Guillot, A., Leveau, J., Boubetra, A., y Billaux, F. (2003). Cold adaptation of *Escherichia coli*: microbiological and proteomic approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2), 171-184. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00119-3)
- Miyamoto, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., y Komatsu, Y. (2000). Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. *Cryobiology*, 41(3), 251-255. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282>
- Moreira, T., Gutiérrez, A., y Heminia, D. (1994). Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. *Biotecnología aplicada*, 11(2), 113-119.
- Moreira, T., Iglesias, E., y Delgado, H. (1995). Preservation of *Neisseria meningitidis* group B by freeze-drying. *Journal of Microbiological Methods*, 23(3), 343-346. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00050-U](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00050-U)
- Obara, Y., Yamai, S., Nikkawa, T., Shimoda, Y., y Miyamoto, Y. (1981). Preservation and transportation of bacteria by a simple gelatin disk method. *Journal of clinical microbiology*, 14(1), 61-66. <https://doi.org/10.1128/jcm.14.1.61-66.1981>
- Rangel, A. V. (2015). *Pruebas de viabilidad a cinco cepas bacterianas criopreservadas y estudio para la liofilización de las mismas, evaluando tres compuestos protectores, pertenecientes al Banco Genético del Laboratorio de Microbiología de la Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas* [Trabajo de grado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. <http://hdl.handle.net/11349/2931>
- Ray, B., y Speck, M. L. (1973). Freeze-Injury in Bacteria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 4(2), 161-213. <https://doi.org/10.3109/10408367309151556>
- Rodríguez, M. (2016). *Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38768/>
- Sánchez, L. C., y Corrales, L. C. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3), 109-13. <https://doi.org/10.22490/24629448.23>
- Siberry, G., Brahmadathan, K. N., Pandian, R., Lalitha, M. K., Steinhoff, M. C., y John, T. J. (2001). Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(1), 43-47.
- Sleight, S., Wigginton, N., y Lenski, R. (2006). Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in *Escherichia coli* following long-term evolution in a

benign environment. *BMC Ecology and Evolution*, 6, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-104>

Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Martins, L., Olivier, A., y Venturini, M. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.044>

Universidad de Antioquia. (2018). *Plan de acción institucional Universidad de Antioquia 2018-2021*.

World Federation for Culture Collections. (2010). *Guidelines For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*. <https://www.wfcc.info/guideline>

Wang, G., Pu, J., Yu, J., Xia, Y., y Ai, L. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066-3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>

Yang, J., Xu, Y., Luo, S., Dang, H., y Cao, M. (2022). Effect of cryoprotectants on rat kidney decellularization by freeze-thaw process. *Cryobiology*, 105, 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.180>