

## Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos

### Evaluation of the stability of *Trichoderma* sp. and *Azotobacter* sp. preserved by different methods

Yvonne Sarmiento Rangel\*, Ariadna Hazel Vergel\*\*, Diana María Cárdenas Caro\*\*\*

#### Resumen

En el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander (Cúcuta, Colombia) constantemente ingresan al Banco de Cepas, cultivos microbianos de interés biotecnológico, especialmente del sector agrícola, los cuales son utilizados en las actividades de docencia e investigación. Por esta razón, existe el interés de mantener viables a través del tiempo estos cultivos microbianos, para lo cual se realizó en esta investigación, la evaluación de la estabilidad de los aislados de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp., utilizando las técnicas de conservación en viales con solución salina estéril (0,85% NaCl) en refrigeración (4°C) y temperatura ambiente (30°C), suelo estéril en refrigeración (4°C), comparados con la metodología de repiques sucesivos como tratamiento control. Los resultados no mostraron diferencias significativas según el Test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ) en la tasa de supervivencia microbiana entre los métodos de conservación. Sin embargo, se observó en las técnicas de viales con solución salina estéril y suelo estéril mantenidos en refrigeración, mayor estabilidad en la concentración celular durante los cuatros meses de evaluación, sin registrar contaminación en los cultivos. Así mismo, se registró un óptimo crecimiento macroscópico de los cultivos microbianos y sus características microscópicas se mantuvieron estables en estos dos métodos de conservación. Por esta razón, se seleccionaron como técnicas de conservación de estos microorganismos, teniendo en cuenta además, ventajas como la facilidad de la técnica, disponibilidad de equipos, materiales y personal con los que se cuenta en el laboratorio.

**Palabras clave:** banco de cepas, conservación de microorganismos, viabilidad celular, *Trichoderma* sp., *Azotobacter* sp.

#### Abstract

In the Laboratory of Applied Microbiology of the University Francisco de Paula Santander (Cúcuta, Colombia), strains of microbial cultures of biotechnological interest are constantly entering, particularly from the agricultural sector, which are used for teaching and research activities. There is an interest in keeping them viable over time, which was the main reason of this research: To evaluate the stability of the isolates of *Trichoderma* sp. and *Azotobacter* sp., using different conservation techniques: vials with saline solution (0,85% NaCl) in two temperature conditions: refrigeration (4°C) and room temperature (30°C), sterile soil under refrigeration (4°C), and successive peals methodology as the control treatment. Results showed no significant differences according to Duncan test ( $P \leq 0.05$ ) in the microbial survival ratio between preservation methods. However, a greater stability in cell concentration was observed with the techniques of vials with sterile saline solution and sterile soil –both under refrigeration–, during the four-month evaluation, with no register of contamination on cultures. Also, there was an optimum growth of microbial cultures macroscopically and the microscopic characteristics were stable in these two methods of preservation for both strains. For this reason, we suggest these conservation techniques for the

\* Ingeniera Biotecnológica, Semillero de Investigación Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación, Universidad Francisco de Paula Santander.

\*\* Ingeniera de Producción Biotecnológica. Asistente del Laboratorio de Microbiología Aplicada. Semillero de Investigación Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación, Universidad Francisco de Paula Santander.

\*\*\* Docente MSc. Departamento de Biología, Coordinadora del Semillero de Investigación Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación, Universidad Francisco de Paula Santander. Av. Gran Colombia No.12E-96 Colsag. E-mail: diana.cardenascao@hotmail.com

two microorganisms, considering further advantages such as ease of technology, availability of equipment, materials and personnel available in the laboratory.

**Keywords:** bank of strains, conservation of microorganisms, cell viability, *Trichoderma* sp., *Azotobacter* sp.

**Recibido:** octubre 18 de 2012

**Aprobado:** junio 12 de 2013

## Introducción

El creciente uso de microorganismos en la biotecnología ha acrecentado la necesidad de conservar los cultivos microbianos, de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables, puesto que son el resultado de investigaciones realizadas por varios años y que han ido conformando una colección microbiana valiosa para cada centro de investigación (Weng *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2006). Estas colecciones adquieren cada vez mayor importancia como mecanismo para la conservación *ex situ* de la biodiversidad y permiten garantizar la idoneidad y reproducibilidad de la experimentación (Pinzón *et al.*, 2009).

Existen diferentes métodos para la preservación de los microorganismos y es importante mencionar que ninguno de ellos es universal, por lo que se debe elegir el método que más se ajuste a las necesidades de la colección, teniendo en cuenta los medios técnicos, la infraestructura del laboratorio, incluyendo los equipos disponibles en el mismo y el microorganismo que se desea preservar (Pérez *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010). La conservación microbiana contempla métodos de conservación a corto, mediano y largo plazo. La preservación a corto plazo se utiliza cuando los laboratorios no tienen la infraestructura adecuada, como es el caso de los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Francisco de Paula Santander, donde el método utilizado hasta el momento, ha sido la resiembra continua o repiques sucesivos para la conservación de microorganismos aislados en diferentes investigaciones a partir de muestras de suelos y aguas de interés regional, los cuales conforman la colección de microorganismos de los diferentes laboratorios que apoyan las actividades académicas e investigativas. Sin embargo, se ha observado que no es una técnica adecuada y muchas de las cepas bacterianas y fúngicas han perdido su viabilidad, y otras más presentan microorganismos contaminantes, impidiendo el mantenimiento de cultivos puros a través del tiempo, haciendo improductivo el esfuerzo del personal que ha aislado estos microorganismos. Este sistema de conservación en subcultivos seriados o repiques sucesivos es también el que tradicionalmente se ha utilizado en Colombia. Sin embargo, es un método costoso, dis-

pendioso, que demanda tiempo y puede ocasionar pérdida de la cepa por contaminación cruzada entre los diferentes cultivos, deshidratación y alteración de sus características genéticas (Sánchez y Corrales, 2005; Torres *et al.*, 2008).

Con el fin de seleccionar el método de conservación más adecuado, se realizan evaluaciones de viabilidad celular, pureza e incluso la determinación de la actividad biológica por la cual se aisló el microorganismo (Henaó *et al.*, 2006). En este sentido, Panizo *et al.* (2005) encontraron que los métodos de conservación de Castellani (1939) de agua y capa de aceite mineral han garantizado la preservación adecuada durante períodos de más de 20 años de 346 cepas de levaduras, 300 hongos filamentosos y 17 actinomicetos, asegurando su viabilidad, pureza y estabilidad morfológica. Henaó *et al.* (2006) evaluaron métodos de conservación para el *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica y obtuvieron el mejor resultado con la conservación en agua destilada suplementada con NaCl al 85% y en suelo estéril con más del 80% de supervivencia. La modificación con la adición de NaCl al método de Castellani o agua destilada estéril, permitió la regulación del balance osmótico celular y por tanto mejoró considerablemente la viabilidad de los cultivos. Por tal razón, en este trabajo se evaluó este método de conservación frente a los cultivos seriados y la preservación en suelo estéril, el cual es también un método a corto plazo, considerado alternativo ya que se utiliza opcionalmente cuando no es posible utilizar un método más estable como la liofilización o crioconservación, ya sea por los costos o por que el microorganismo no resiste estos tratamientos (Pinzón *et al.*, 2009; Morales-García *et al.*, 2010). La utilización de suelo como soporte permite que los microorganismos se adhieran bien a los agregados que no son desnaturalizados por el proceso de esterilización y por tanto se permita un mayor mantenimiento de la viabilidad microbiana (Henaó *et al.*, 2006).

Con base en estas técnicas de conservación de bajos requerimientos, el objetivo de este trabajo fue seleccionar e implementar métodos de conservación más estables como los viales con solución salina en refrige-

ración y temperatura ambiente, cultivo en suelo estéril, teniendo en cuenta que son los únicos métodos para los cuales actualmente se cuenta con la disponibilidad de materiales, equipos, tiempo y recursos humanos en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Francisco de Paula Santander.

## Materiales y métodos

### Cultivos microbianos

Los microorganismos utilizados fueron una cepa de *Azotobacter* sp. aislada de suelos arroceros del Distrito de Riego del Río Zulia en Norte de Santander (Colombia) y una cepa de *Trichoderma* sp. aislada del cultivo de rosa del invernadero “Flores Iscalá” (Chinácota, Norte de Santander, Colombia). Estos cultivos microbianos estaban conservados por el método de repiques sucesivos en el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander. Estas cepas se activaron para realizar un Banco de trabajo de 6 cajas Petri con *Azotobacter* sp. en agar Ashby (Manitol 15 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,3 g/L; NaCl 0,3 g/L; CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/L; agar-agar 18 g/L; pH 7,2) incubado por 10 días a 32°C y 6 con *Trichoderma* sp. en agar PDA incubado por 7 días a 28°C.

### Preparación de los métodos de conservación microbiana

Se desarrollaron tres métodos de conservación de células microbianas, en un diseño experimental completamente al azar donde se determinó la viabilidad de los cultivos durante cuatro meses para evaluar la estabilidad de los métodos. Los métodos que se evaluaron en cada cepa constituyeron cada tratamiento, como se describe en la tabla 1.

Cada tratamiento consistió de 30 repeticiones, con las cuales se realizó un muestreo destructivo a partir de las 48 h de realizada la conservación para evaluar la pureza de las cepas conservadas. El muestreo se realizó mensualmente durante 4 meses. De cada tratamiento se seleccionaron 5 viales por mes para realizar el recuento de UFC mL<sup>-1</sup> o UFC g<sup>-1</sup>.

**Repiques sucesivos en viales con agar 4°C (T0).** Los microorganismos se inocularon por el método de estría en 30 tubos de ensayo con agar Ashby inclinado para *Azotobacter* sp. y se incubaron a 32°C durante 9 días. Así mismo, *Trichoderma* sp. se inoculó en 30 tubos de ensayo con agar PDA inclinado y se incubaron durante 7 días a 28°C. Posteriormente se llevaron a refrigeración en una temperatura de 4°C para iniciar la evaluación del método.

**Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en temperatura 30+/-2°C (T1) y Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en refrigeración 4°C (T2).** A partir de una cepa del Banco de Trabajo de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp., se preparó una suspensión celular de cada microorganismo. Esta suspensión se obtuvo arrastrando con un asa bacteriológica redonda todas las colonias del cultivo, las cuales se transfirieron a un erlenmeyer con 100 mL de solución salina estéril (NaCl 0,85%). Esta suspensión celular se dispensó en un volumen de 1 mL por vial en 30 viales estériles. Los viales correspondientes al T1 se conservaron en temperatura de 30+/-2°C en condiciones de oscuridad en un lugar seco y los viales del T2 se refrigeraron a una temperatura de 4°C.

**Suelo estéril en refrigeración 4°C (T3).** A partir de una cepa del Banco de Trabajo de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp. se preparó una suspensión celular de cada microorganismo. Esta suspensión se obtuvo arrastrando con un asa bacteriológica redonda

Tabla 1. Métodos de conservación evaluados

Tratamiento	Metodología	Referencia
T0	Repiques sucesivos en viales con agar 4°C	Control: Método que se utiliza en los Laboratorios de Biotecnología de la UFPS
T1	Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en temperatura 30+/-2°C	Henao et al. (2006)
T2	Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en refrigeración 4°C	Henao et al. (2006); Weng et al. (2005)
T3	Suelo estéril en refrigeración 4°C	Carrillo et al. (1998)

todas las colonias del cultivo, las cuales se transfirieron a un erlenmeyer con 100 mL de solución salina estéril (NaCl 0,85%). Esta suspensión se inoculó en un volumen de 1 mL por vial en 30 viales con una mezcla homogénea de 5 g de suelo estéril (3:1:1 de suelo:lombrinaza:arena). Los viales se refrigeraron a una temperatura de 4 °C después de su incubación durante 7 días.

#### **Determinación de la viabilidad cuantitativa.**

La metodología de repiques mensuales se utilizó como testigo para evaluar los tres métodos de conservación. Esta evaluación se realizó mensualmente durante un período de cuatro meses con el fin de determinar si alguno de estos métodos puede utilizarse para suplir los repiques sucesivos que se llevan a cabo actualmente en los Laboratorios de Biotecnología.

**Tratamientos T0 (Repiques mensuales).** Se tomaron al azar 5 repeticiones de cada microorganismo conservado. El medio de cultivo se homogenizó con las colonias formadas y se agregó 1 mL de solución salina estéril (0,85% NaCl). A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  en 9 mL de solución salina (0,85% NaCl). Estas diluciones se utilizaron para realizar el recuento en placa de UFC mL<sup>-1</sup> para *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp.

**Tratamientos T1 (Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en temperatura 30+/-2°C), T2 (Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en refrigeración 4°C).** De cada tratamiento se tomaron 5 repeticiones según el microorganismo conservado. De cada vial eppendorf se tomó una muestra de 1 mL directamente de la suspensión celular formada, para realizar las respectivas diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  en 9 mL de solución salina estéril (0,85% NaCl) y con las diluciones se realizó el recuento en placa de la misma forma que para el tratamiento anterior.

**Tratamiento T3 (cultivo en suelo estéril + Refrigeración a 4°C).** Se tomaron 5 repeticiones de cada microorganismo conservado en T3 y se pesó 1 g de suelo de cada uno a partir de los cuales se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  en 9 mL de solución salina estéril (0,85% NaCl) y se realizó el recuento en placa de la misma forma que para los tratamientos anteriores.

Para todos los tratamientos, se sembraron 20 µL de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  de *Azotobacter* sp. en medio Ashby para realizar el recuento en placa utilizando la técnica de microgota (Moreno et al., 2000). El recuento en placa de *Trichoderma* sp. se realizó en agar Avena (Avena 20 g/L; agar-agar 20 g/L; pH 6,0)

sembrando 100 µL de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Cuando se formaron las colonias de *Trichoderma* sp. se realizó el recuento de las UFC mL<sup>-1</sup> antes de que se desarrollara su esporulación masiva.

#### **Análisis estadístico**

El recuento de la población microbiana en UFC mL<sup>-1</sup> o g<sup>-1</sup> según cada método de conservación, se transformó a unidades Log<sub>(10)</sub>. El comportamiento de esta población microbiana se observó a través de gráficas y se cuantificó la viabilidad al final del período de evaluación, según la ecuación  $(X_f / X_0) * 100$  (Zamora, 2003) y se expresó como la tasa de supervivencia microbiana (Muñoz-Rojas et al., 2006). A partir de estos resultados, se realizó un análisis de varianza a través de un modelo lineal general univariante y pruebas de comparación múltiple *post hoc* para las medias observadas a través de la prueba de Duncan para un nivel de significancia de 0,05 en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19.

#### **Determinación de la viabilidad cualitativa**

A las 48 h de conservadas las cepas, se seleccionó al azar un vial de cada tratamiento de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp., y se realizó una siembra por agotamiento sobre agar Ashby y Avena, respectivamente. La viabilidad se consideró positiva cuando se observó crecimiento sobre las estrías, teniendo en cuenta que se hubiesen formado sólo colonias con las mismas características a las descritas inicialmente para cada microorganismo, correspondientes a la forma, aspecto y color de la colonia. También se realizó tinción con azul de lactofenol a los cultivos con *Trichoderma* sp. y tinción de Gram a los cultivos de *Azotobacter* sp. para observar la morfología de los conidios y conidióforos y la formación de células Gram negativas y quistes, respectivamente. En cada caja de cultivo se inspeccionó la presencia de colonias contaminantes de otras bacterias y hongos. Este mismo procedimiento se realizó a los 4 y 6 meses de conservación.

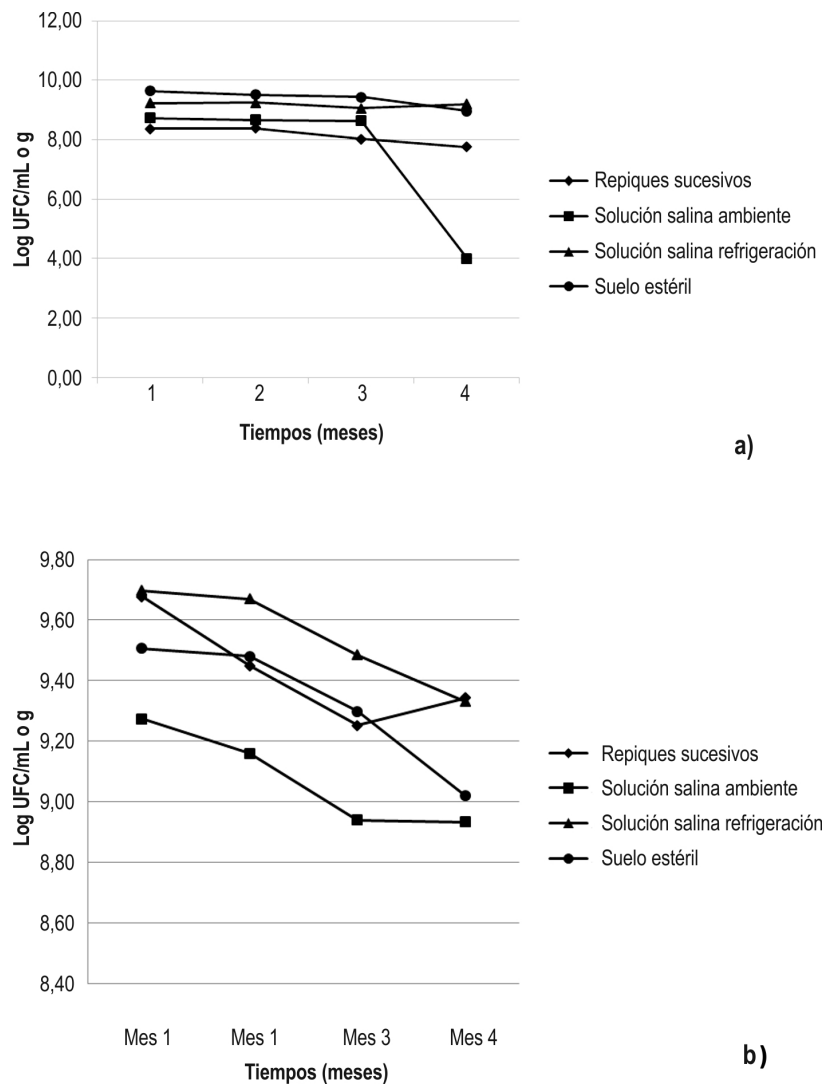
#### **Resultados y discusión**

##### **Viabilidad cuantitativa de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp.**

Durante los cuatro meses de evaluación del recuento de población de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp., se observó una disminución gradual en todos los métodos de conservación.

Respecto a la conservación de *Azotobacter* sp., se observó una disminución de 1 unidad Log de UFC mL<sup>-1</sup> en el método de repiques sucesivos (control) y de 4 unidades Log de UFC mL<sup>-1</sup> hacia el cuarto mes, en el tratamiento en viales con solución salina a temperatura de 30 +/- 2°C (figura 1a.). Los otros dos métodos de conservación presentaron mayor estabilidad durante los cuatro meses y por lo tanto su tasa de supervivencia al final de este período resultó de 93,81 en viales con suelo estéril y de 99,88 en viales con solución salina estéril en refrigeración a 4°C (tabla 2). Únicamente el tratamiento de viales con solución salina a temperatura ambiente de 30+/-2°C, presentó una baja tasa de supervivencia de 46,40, hacia el último mes de evaluación y fue significativamente diferente de los

demás tratamientos (P≤0,05). Estos resultados coinciden con los registrados por Pérez *et al.* (2006), quienes encontraron esta desventaja en la conservación de bacterias del género *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp. en agua destilada estéril a temperatura ambiente y registraron sólo una tasa de supervivencia de 50 y 75, respectivamente, atribuido a que este rango de temperaturas no detienen el metabolismo celular y los microorganismos pueden continuar con su crecimiento y dado que no hay nutrientes en el agua, las células pierden su viabilidad. Este método también presentó colonias contaminantes de hongos y bacterias, desde el segundo mes de evaluación y por tanto no se considera aceptable para su utilización en el laboratorio.



**Figura 1.** Recuento en placa de Log UFC de a) *Azotobacter* sp. b) *Trichoderma* sp. durante cuatro meses en cada método de conservación



Por su parte, el recuento inicial de la población de *Trichoderma* sp. en los cuatro métodos de conservación, estuvo en un rango entre 9,27 y 9,68 unidades Log de UFC mL<sup>-1</sup> o g (Figura 1b.). Hacia el final del período de evaluación se observó una disminución hasta en un rango de 8,93 y 9,34 unidades Log de UFC mL<sup>-1</sup> o g. La conservación en repiques sucesivos y viales con solución salina en temperatura de 30 +/- 2°C, presentaron una disminución de casi 1 unidad Log de UFC mL<sup>-1</sup>, lo cual sugiere la necesidad de realizar nuevas conservaciones en un período de tiempo más corto. En este método también se encontró contaminación por otros hongos, lo cual indica que no se asegura la pureza de las cepas a corto plazo. El método de conservación más estable durante los cuatro meses para la cepa *Trichoderma* sp. fue el de viales con solución salina estéril en refrigeración de 4°C.

Según el análisis de varianza realizado para evaluar la viabilidad cuantitativa de *Trichoderma* sp. en los diferentes métodos de conservación utilizados no presentaron diferencias significativas entre sí (P≤0,05) en cada microorganismo y se obtuvieron valores por encima de 93,47 en la tasa de supervivencia al final de los cuatro meses de evaluación.

La conservación de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp. en la técnica de viales con solución salina estéril en refrigeración a 4°C, presentó una tasa de supervivencia de 99,88 y 93,47, respectivamente, lo cual sugiere que es una técnica estable y adecuada para el mantenimiento de las cepas. Estos resultados coinciden con los reportados por Henao et al. (2006), quienes encontraron mayor estabilidad con la conservación en solución salina estéril de una cepa de *Aspergillus niger*, comparada con la conservación en glicerol a -20°C, suelo estéril y tierra de diatomeas estéril en refrigeración a

4°C. Este método con solución salina estéril, fue modificado a partir de la conservación en agua destilada estéril, la cual es una técnica simple, económica y capaz de asegurar la supervivencia de los cultivos de hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias por períodos prolongados y diversas colecciones microbianas la utilizan (García y Uruburú, 2000; Panizo et al., 2005; Martínez et al., 2009). Sin embargo, esta modificación puede contribuir con la disminución de la pérdida de la viabilidad microbiana como consecuencia del daño citoplasmático y la desestabilización de procesos osmóticos que se presenta en algunas ocasiones cuando no se adiciona NaCl (Vásquez, 2000 citado por Henao et al., 2006), y de esta forma se logra el mantenimiento del cultivo microbiano a mediano plazo.

El método en viales con suelo estéril también se consideró adecuado para el mantenimiento de la viabilidad de *Azotobacter* sp. (Tasa de supervivencia de 93,81) y *Trichoderma* sp. (Tasa de supervivencia de 98,17). En este sentido, Estrada et al. (1998) citados por Pérez et al. (2006), reportaron 100% de viabilidad al conservar bacterias del género *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp. en suelo estéril durante dos años en condiciones de refrigeración. Henao et al. (2006), también reportaron un alto porcentaje de viabilidad en la conservación de *Aspergillus niger*, por este método, lo cual fue argumentado citando a Vásquez (2000), quien sugiere que se pudo haber producido por que los conidios del hongo, posiblemente tienen afinidad con los agregados del suelo que no fueron desnaturalizados por el proceso de esterilización. Si se tiene en cuenta que el suelo utilizado en este estudio fue preparado utilizando una mezcla homogénea de 3:1:1 de suelo: lombrinaza:arena, podría sugerirse que los coloides presentes en la lombrinaza como fuente de materia orgánica, mejoraron las condiciones de conservación

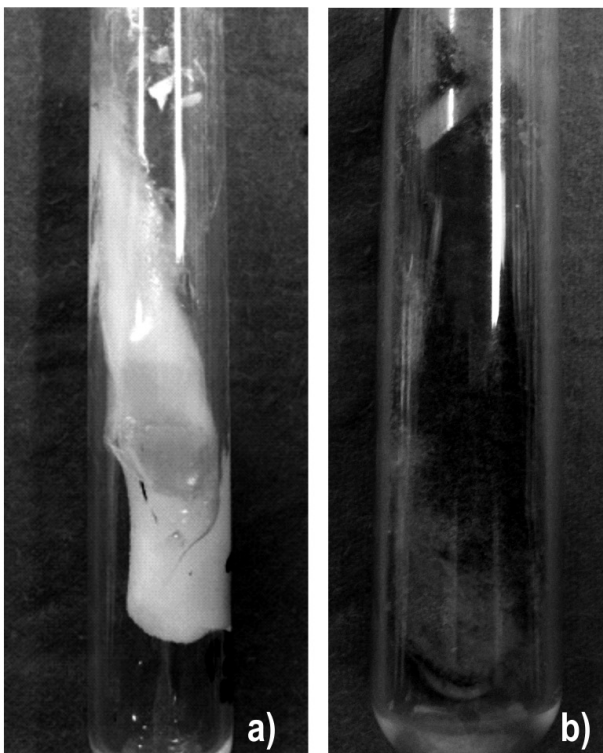
**Tabla 2.** Tasa de supervivencia de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp. según el método de conservación después de 4 meses

Metodología	Tasa de supervivencia de <i>Azotobacter</i> sp.	Tasa de supervivencia de <i>Trichoderma</i> sp.
Repiques sucesivos en viales con agar 4°C	93,49 a <sup>(1)</sup>	96,56 a
Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en temperatura 30+/-2°C	46,40 b	96,41 a
Viales con solución salina (0,85% NaCl) estéril en refrigeración 4°C	99,88 a	93,47 a
Suelo estéril en refrigeración 4°C	93,81 a	98,17 a

<sup>(1)</sup> Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí por el Test de Duncan (P≤0,05)

frente a la desecación de los microorganismos (Kuss, 2006). Este método actúa como protector de los microorganismos, los cuales se adhieren a las partículas del suelo cuando ocurre la desecación con el objetivo de detener el crecimiento microbiano mediante la eliminación del agua disponible de la célula (Henao et al. 2006; Morales-García et al., 2010). De acuerdo a ello, esta técnica también podría ser utilizada en la conservación no sólo de otros hongos filamentosos productores de conidias y bacterias como *Azotobacter* que producen células enquistadas en condiciones adversas, sino de bacterias del género *Bacillus* formadoras de esporas, que frecuentemente son aisladas de suelos y en el caso del Banco de Cepas de los Laboratorios de Biotecnología, representa aproximadamente el 55% del total de cepas bacterianas existentes.

Por su parte, el método de conservación por repiques sucesivos (control), presentó una tasa de supervivencia de 93,49 en la cepa de *Azotobacter* sp. y 96,56 en la cepa de *Trichoderma* sp. Además, se observó que el medio de cultivo agarizado presentó una deshidratación severa y por lo tanto, no permite el mantenimiento de los microorganismos en un período mayor a tres meses (figura 2).



**Figura 2.** Medios de cultivo deshidratados después de tres meses en el método de repiques sucesivos. a) *Azotobacter* sp. b) *Trichoderma* sp.

Con lo anterior, se evidencia que el mantenimiento de las cepas de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp., por este método de conservación, requiere que se realice un repique cada dos meses, aunque lo más recomendado sería la resiembra en un tiempo no mayor a un mes (Morales-García et al., 2010). De esta forma podría garantizarse un cultivo fresco antes de la pérdida del cultivo predecesor (Pinzón et al., 2009) ocasionado por la deshidratación del agar utilizado. Sin embargo, no sería viable económicamente considerando que se requiere un gasto frecuente de medios de cultivo y energía eléctrica para las labores de resiembra y, adicionalmente, este repique de las cepas mensual y bimensualmente, podría producir mutaciones y adaptación de los microorganismos al medio de cultivo, lo que puede generar cepas “domesticadas” cuyo comportamiento ya no represente a la especie inicialmente aislada (Morales-García et al., 2010).

Según los resultados obtenidos, se seleccionaron los métodos de conservación en viales con solución salina estéril (NaCl 0,85%) refrigerados a 4°C y viales con suelo estéril, para la conservación de los dos microorganismos, teniendo en cuenta que fueron los más estables en el mantenimiento de la viabilidad celular y la pureza de los cultivos. Por esta razón, en el Manual de Procedimientos del Banco de Cepas de los Laboratorios de Biotecnología, se recomendó mantener estos microorganismos utilizando los dos métodos de conservación simultáneamente, de tal forma que si condiciones externas afectan la estabilidad de alguno de los métodos utilizados, habrá otro bajo distintas condiciones que evite la pérdida de los cultivos, asegurando su pureza, viabilidad y estabilidad celular (Pinzón et al., 2009).

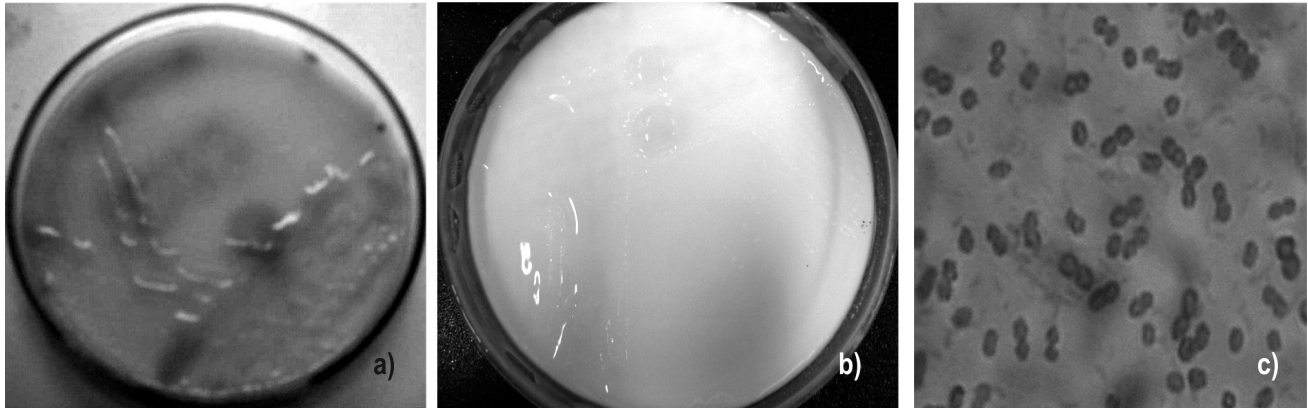
#### **Viabilidad cualitativa de *Azotobacter* sp. Y *Trichoderma* sp.**

El crecimiento de la cepa de *Azotobacter* sobre el agar Ashby se obtuvo después de 48-72 h de incubación y la producción del pigmento café se observó a partir del quinto día con la respectiva producción de quistes, los cuales fueron observados mediante la tinción de Gram (figura 3). Durante los cuatro meses de evaluación se encontró el mismo comportamiento macro y microscópico en todos los métodos de conservación utilizados. Sólo en el tratamiento de viales con solución salina estéril conservado a temperatura ambiente (30+/-2°C), se presentaron colonias de hongos y otras bacterias en el segundo mes de evaluación, lo cual indica que la preservación por este método, no se recomienda a mediano plazo para evitar pérdida del cultivo por contaminación ambiental. Adicional-

mente, de acuerdo a los resultados de la pérdida de viabilidad celular con esta técnica de conservación, se descartó su utilización para el Banco de Cepas de los Laboratorios de Biotecnología.

Por su parte, el crecimiento macroscópico de *Trichoderma* sp. comenzó a los tres días de incubación, con el desarrollo de micelio y su esporulación se observó a partir del día 4 hasta el día 7, donde se produjo la máxima coloración verde característica de la cepa

original (figura 4). El desarrollo microscópico mostró la formación de conidióforo ramificado con fiáldes produciendo grupos de conidias globosas y se observaron clamidosporas terminales e intercalares (Barnett y Hunter, 1998). De acuerdo a esto, se consideró que no se presentaron cambios significativos en el desarrollo del aislado de *Trichoderma* sp. conservado con las técnicas de viales con solución salina y suelo estéril en refrigeración (4°C).

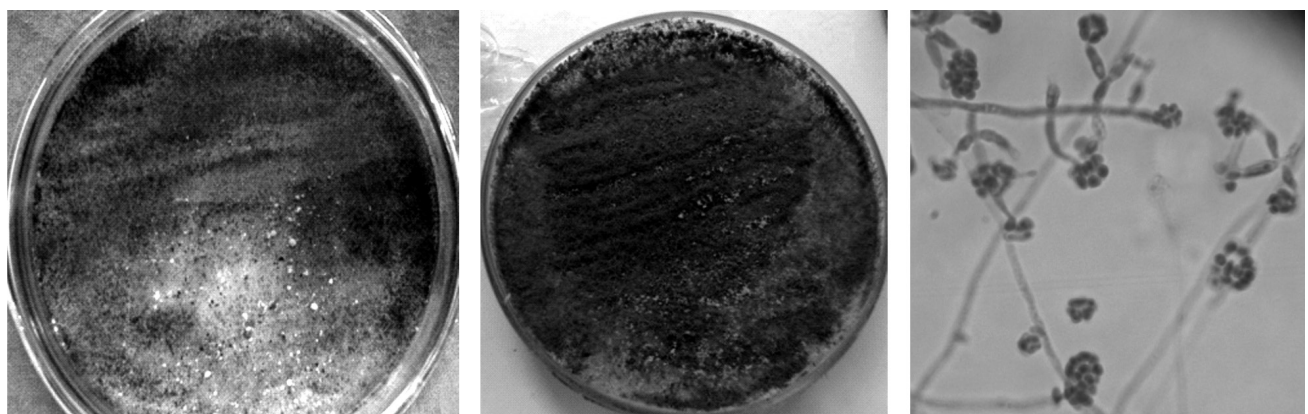


**Figura 3. Desarrollo morfológico de *Azotobacter* sp.** a) Crecimiento en agar Ashby de la cepa antes de conservación b) Crecimiento en agar Ashby de la cepa después de conservación en viales con solución salina estéril (4°C) c) Observación microscópica de quistes (Aumento 1000x)

Al cabo de 6 meses de conservación las cepas de *Azotobacter* sp. y *Trichoderma* sp., aumentaron el número de días requeridos para comenzar el crecimiento en las cajas de agar de hasta 8 - 12 días. Por lo cual, fue necesario incluir en el Manual de Procedimientos del Banco de Cepas de los Laboratorios de Biotecnología, una etapa de activación de la cepa de *Azotobacter* sp.,

contenida en un vial de solución salina estéril, en caldo Ashby y luego repicarla en agar Ashby, donde su crecimiento comienza nuevamente a las 48-72 h.

En el caso de la cepa de *Trichoderma* sp., se recomendó la inclusión de activación de 200 µL del contenido de un vial con solución salina estéril, en medio de cul-



**Figura 4. Desarrollo morfológico de *Trichoderma* sp.** a) Crecimiento en agar Avena de la cepa antes de conservación b) Crecimiento en agar Avena de la cepa después de conservación en viales con solución salina estéril (4°C) c) Observación microscópica (Aumento 400x)



tivo de granos de arroz (20 g de arroz, 12 mL de agua destilada y dos gotas de ácido láctico) esterilizado por 15 min a 121°C y 15 Lb de presión. A partir de este cultivo se deben inocular en agar Avena para obtener un crecimiento bien esporulado en un período de 4-7 días.

En el mismo Manual se recomendó la realización de evaluaciones de la viabilidad y pureza de los viales conservados en solución salina estéril y suelo estéril cada dos meses y realizar las medidas correctivas para evitar la pérdida de la cepa microbiana.

## Conclusiones

Parámetros de viabilidad (tasa de supervivencia de los microorganismos), estabilidad de características macro y microscópicas de los cultivos microbianos de los aislados de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. y el mantenimiento de su pureza, indicaron que las técnicas de conservación más adecuadas fueron los viales con solución salina estéril (0,85% NaCl) y viales con suelo estéril, ambos en refrigeración a 4°C. Estos métodos presentaron un alto porcentaje de viabilidad y no registraron contaminación microbiana, y debido a la naturaleza del medio de conservación utilizado, no presentaron problemas de deshidratación.

Estos dos métodos se establecieron para el mantenimiento de la diversidad de aislados de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. que se encuentran en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Francisco de Paula Santander, considerando que son viables económica y técnicamente, teniendo en cuenta la disponibilidad actual de materiales, equipos y personal de estos Laboratorios.

## Referencias bibliográficas

Barnett H.L., Hunter B.B. 1998. *Illustrated Genera of imperfect fungi*. Minnesota, U.S.A: Burgess Publishing Company. 3 ed.

Castellani A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42: 225-226.

Carrillo A., Puente M.E., Castellanos E., Bashan Y. 1998. *Aplicaciones Biotecnológicas de Ecología Microbiana. Manual de Laboratorio*. La Paz, México: CIB press y Bogotá: Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. 51 p.

García M.D., Uruburú F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad Sociedad Española de Microbiología -SEM*. 30: 12-16.

Henao I., Franco-Correa M., Marín G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum*. 11(2): 51-60.

Kuss A. V. 2006. *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. Tesis Doctoral. Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria.

Martínez A., León M., González G. 2009. Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar- ICIDCA*. 2: 47-50.

Morales-García Y.E., Duque E., Rodríguez-Andrade O., de la Torre J., Martínez-Contreras R.D., Pérez-y-Terrón R., Muñoz-Rojas J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14(2): 11-29.

Moreno B., Diez V., García M., Menes L., Gutiérrez M., Polledo F. 2000. *Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración*. Zaragoza, España: Editorial Acribia. Traducción de "Microorganisms in Foods 1: Their Significance and Methods of Enumeration". The International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J.L. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1):472-477.

Parra S.L., Pérez M.M., Bernal M., Suárez Z., Montoya D. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *NOVA- Publicación Científica*. 4(5): 39-49.

Panizo M.M., Reviákina V., Montes W., González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(1):35-40.

Pérez J., Casa M., Beltrán C. 2006. Conservación de bacterias por el método de suspensión en agua destilada estéril. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEyypuAkVvKZ-bgsuuRu.php>

Pinzón Y.A., Bustamante S.L., Buitrago, G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2): 8-18.

Sánchez L.C., Corrales L.C. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA- Publicación Científica*. 3(4):21-29.

Torres L.D., Ortiz D., Rodríguez J.L., Patiño R.E. 2008. Comparación de tres tratamientos para la crioconservación de serovares de *Leptospira* en nitrógeno líquido. *Revista CORPOICA-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 9(2):72-76.

Weng Z., Díaz O.E., Álvarez I. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 43(3):1-4.

Zamora, L. M. 2003. *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero*. Tesis de Doctorado. Gerona, España: Universidad de Girona.