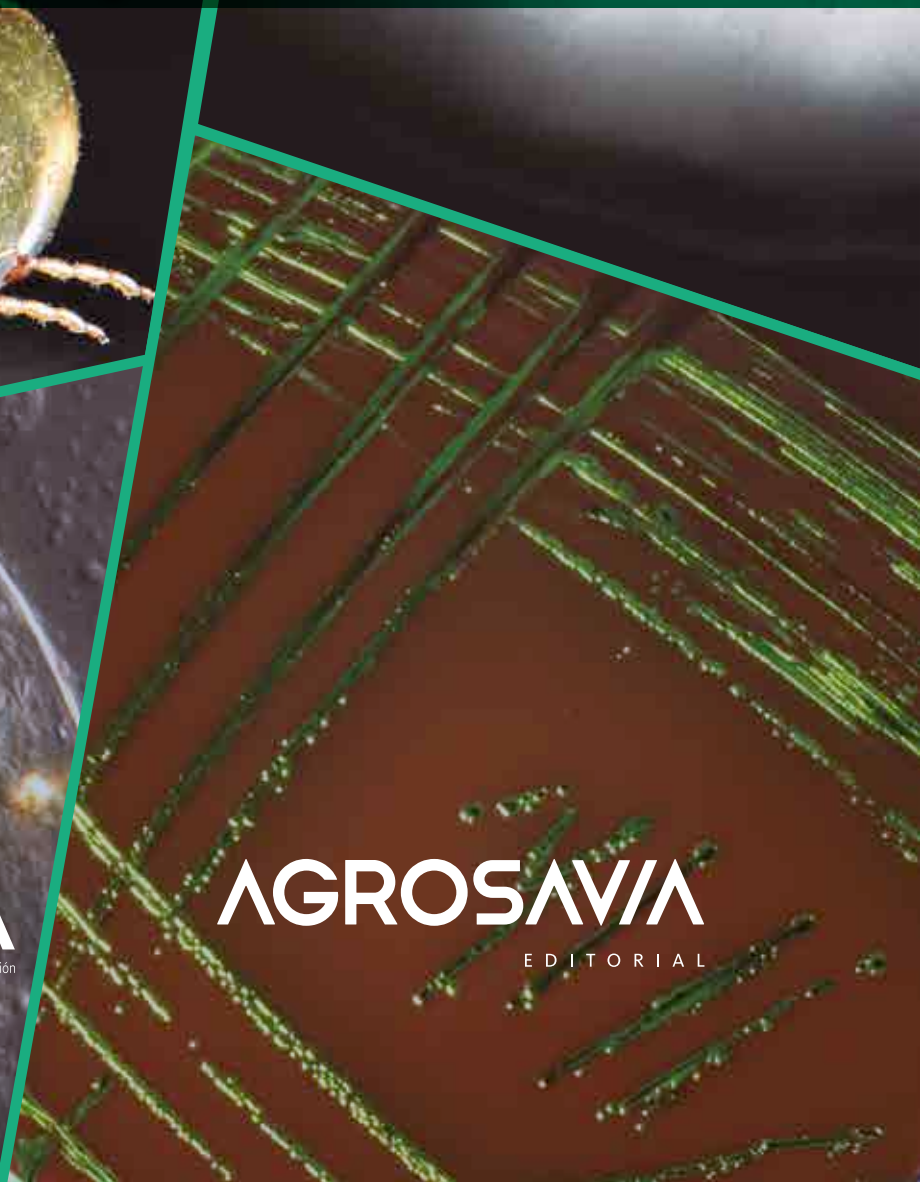




# CONSERVACIÓN Y MANEJO de la diversidad microbiana en los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en Colombia



**BGAA**  
Banco de Germoplasma para la Alimentación  
y la Agricultura

**AGROSAVIA**

EDITORIAL

# CONSERVACIÓN Y MANEJO de la diversidad microbiana en los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en Colombia

Leidy Patricia Tibaduiza Castañeda

Juan Camilo Ovalle Másmela

Lina Marcela Botero Rute

**Editores**



**BGAA**

Banco de Germoplasma para la Alimentación  
y la Agricultura

**AGROSAVIA**

EDITORIAL

**Conservación y manejo de la diversidad microbiana en los bancos de germoplasma para la alimentación y la agricultura en Colombia.** / editado por: Leidy Patricia Tibaduiza Castañeda; Juan Camilo Ovalle Masmela y Lina Marcela Botero Rute. -- Mosquera, (Colombia) : AGROSAVIA, 2021.

236 páginas (Colección Análisis y reflexiones en torno al sector agropecuario)

Incluye tablas y fotos.

ISBN E-book: 978-958-740-484-5

ISBN obra impresa: 978-958-740-483-8

1. Agrobiodiversidad 2. Banco de germoplasma 3. Colecciones de material genético 4. Microorganismos 5. Recursos genéticos. I. Tibaduiza Castañeda, Leidy Patricia (Editora) II. Ovalle Masmela, Juan Camilo (Editor) III. Botero Rute, Lina Marcela (Editora).

**Palabras clave normalizadas según Tesauro Multilingüe de Agricultura AgroVoc**

Catalogación en la publicación – Biblioteca Agropecuaria de Colombia

## Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA

Sede Central. Kilómetro 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca. Código postal: 250047, Colombia.

Centro de Investigación Palmira: diagonal a la intersección de la carrera 36A con calle 23, Palmira, Valle del Cauca. Código postal: 763532, Colombia.

Centro de Investigación Tibaitatá, Kilómetro 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca. Código postal: 250047, Colombia.

Esta publicación es resultado del macroproyecto de Corpoica (actualmente AGROSAVIA) "Conservación y promoción de uso de los recursos genéticos microbianos de interés para el sector agropecuario".

Primera edición, 800 ejemplares.  
Bogotá, Colombia, noviembre de 2021

### Dirección editorial

**Edición:** Astrid Verónica Bermúdez Díaz

**Corrección de estilo:** Alejandro Merlano Aramburo

**Diseño y diagramación:** Mónica Cabiativa Daza

En portada:

Superior izquierda: *Azospirillum brasilense*, CMIB. Superior

derecha: *Beauveria bassiana*, CMIB. Centro izquierda:

Teleogina de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Inferior izquierda:

Protozooario ruminal. Inferior derecha. *Escherichia coli* en

agar EMB, CMISA

DOI: <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7404845>

Citación sugerida: Tibaduiza Castañeda, L. P., Ovalle Masmela, J. C., & Botero Rute, L. M. (Eds.). (2021).

*Conservación y manejo de la diversidad microbiana en los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en Colombia.* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

Cláusula de responsabilidad: AGROSAVIA no es responsable de las opiniones y de la información recogidas en el presente texto. Los autores asumen de manera exclusiva y plena toda responsabilidad sobre su contenido, ya sea este propio o de terceros, declarando en este último supuesto que cuentan con la debida autorización de terceros para su publicación. Igualmente, expresan que no existe conflicto de interés alguno en relación con los resultados de la investigación propiedad de tales terceros. En consecuencia, los autores serán responsables civil, administrativa o penalmente, frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros, relativa a los derechos de autor u otros derechos que se vulneren como resultado de su contribución.

Línea de atención al cliente: 018000121515

[atencionalcliente@agrosavia.co](mailto:atencionalcliente@agrosavia.co)

[www.agrosavia.co](http://www.agrosavia.co)



[https://co.creativecommons.org/?page\\_id=13](https://co.creativecommons.org/?page_id=13)

# Contenido

Autores .....	13
Agradecimientos .....	21
Prólogo .....	23
Introducción .....	25

## **Capítulo I. Contexto de los Bancos de Germoplasma para la Alimentación de la Nación Colombiana . . . . . 28**

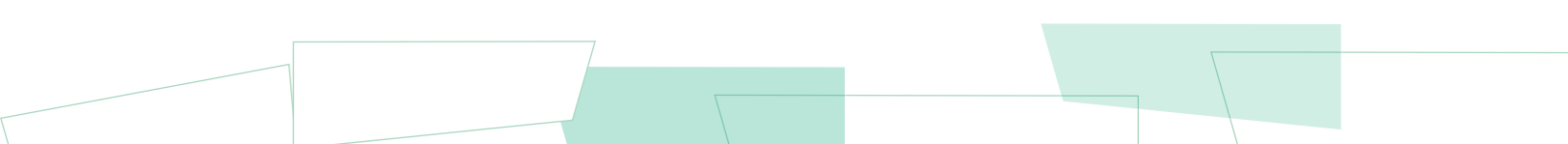
*Carolina González Almario, Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal, Luisa Alejandra Rugeles Barandica, Dubert Yamil Cañar Serna, Leidy Patricia Tibaduiza Castañeda*

Los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en la actualidad. ....	31
Formación y divulgación a partir del fortalecimiento de capacidades técnico-científicas .....	34
Referencias .....	38

## **Capítulo II. Conservación y autenticación de cepas microbianas . . . . . 39**

*Lina Marcela Botero Rute, Juan Camilo Ovalle Másmela, Paola J. Criollo-Campos, Urley A. Pérez-Moncada, Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez, Jennifer Lorena García Riaño, Rocío Fenney Herrera León, Ligia Denise Torres Higuera, Sabrina del Carmen Jiménez Velásquez, David Emigdio López Ardila, Óscar Gabriel Beltrán, Germán A. Estrada-Bonilla, Ruth R. Bonilla Buitrago, Carol Viviana Amaya Gómez, María Camila Rengifo Ibáñez, Fernando Rodríguez Villamizar, Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal*

Generalidades sobre la conservación .....	41
Agentes crioprotectores .....	43



Métodos de conservación .....	45
Autenticación de cepas .....	49
Referencias .....	59

**Capítulo III. Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes (CMIB)..... 66**

*Paola J. Criollo-Campos, Urley A. Pérez-Moncada, Germán A. Estrada-Bonilla, Ruth R. Bonilla Buitrago*

Distribución y géneros encontrados .....	68
Métodos de conservación empleados en la CMIB .....	71
Autenticación de cepas .....	74
Referencias .....	84

**Capítulo IV. Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)..... 88**

*Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez, Jennifer Lorena García Riaño, Carol Viviana Amaya Gómez*

Métodos de conservación empleados en la CMICB .....	92
Autenticación de cepas .....	100
Referencias .....	117

**Capítulo V. Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA)..... 125**

*Juan Camilo Ovalle Másmele, Lina Marcela Botero Rute, Rocío Fenney Herrera León, Fernando Rodríguez Villamizar, Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal*

Los rumiantes .....	127
Microorganismos del rumen .....	129
Cultivo de microorganismos anaerobios.....	133
Aislamiento y cuantificación .....	140



Métodos de conservación empleados en la CMINA . . . . .	144
Viabilidad de las cepas . . . . .	149
Autenticación de cepas . . . . .	151
Referencias . . . . .	160

**Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos) . . . . . 164**

*Ligia Denise Torres Higuera, Sabrina del Carmen Jiménez Velásquez,  
David Emigdio López Ardila, Óscar Gabriel Beltrán, María Camila Rengifo IbÁñez*

Métodos de conservación empleados en la CMISA . . . . .	167
Autenticación de cepas . . . . .	185
Referencias . . . . .	203

**Capítulo VII. Documentación . . . . . 213**

*Juan Camilo Ovalle Másmela, Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez*

Pasaporte de accesión . . . . .	224
Formato de entrega . . . . .	225
Hoja de vida . . . . .	225
Sistema de etiquetado e identificación de las accesiones . . . . .	227
Referencias . . . . .	231
Glosario . . . . .	234

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b>	Línea del tiempo del Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana (BGNC) .....	30
<b>Figura 2.</b>	Mapa actual del BGNC .....	33
<b>Figura 3.</b>	Características de la conservación por liofilización .....	47
<b>Figura 4.</b>	Características de la conservación por criopreservación .....	49
<b>Figura 5.</b>	Posición de los <i>primers</i> y zonas de amplificación para los genes ITS y 16S rARN .....	57
<b>Figura 6.</b>	Los 16 departamentos en los que se realizaron colectas de material biológico .....	69
<b>Figura 7.</b>	Árbol filogenético de las accesiones bacterianas pertenecientes a la Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes (CMIB) .....	70
<b>Figura 8.</b>	Accesión de la CMIB verificada por su viabilidad y pureza .....	72
<b>Figura 9.</b>	Método de conservación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en nevera a 4 °C en su propio medio de multiplicación (suelo + arena cuarcítica) .....	74
<b>Figura 10.</b>	Metodología empleada para la determinación <i>in vitro</i> de la capacidad de las accesiones bacterianas pertenecientes al banco de germoplasma de solubilizar fuentes fosfatadas .....	76
<b>Figura 11.</b>	Metodología empleada para la determinación <i>in vitro</i> de la capacidad de las accesiones bacterianas pertenecientes al banco de germoplasma de producir sustancias tipo indol .....	77
<b>Figura 12.</b>	Método para el aislamiento de esporas de HFMA a partir de muestras de suelo .....	79
<b>Figura 13.</b>	Método para la estimación del porcentaje de colonización a partir de fragmentos de raíces .....	81

<b>Figura 14.</b> Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB .....	82
<b>Figura 15.</b> Esporas de una <i>Gigaspora rosea</i> perteneciente a la CMIB .....	82
<b>Figura 16.</b> Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB .....	83
<b>Figura 17.</b> Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB .....	83
<b>Figura 18.</b> Géneros y especies de las accesiones que conforman la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB) .....	90
<b>Figura 19.</b> Departamentos de origen de las accesiones de la CMICB .....	91
<b>Figura 20.</b> Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de congelación a $-80^{\circ}\text{C}$ ....	93
<b>Figura 21.</b> Crecimiento de <i>Lecanicillium</i> spp. <i>a.</i> Inoculación de discos de agar; <i>b.</i> Inoculación distribuyendo una suspensión sobre el medio de cultivo PDA .....	95
<b>Figura 22.</b> Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de liofilización .....	98
<b>Figura 23.</b> Metodología para la caracterización fisiológica de levaduras ...	104
<b>Figura 24.</b> Prueba de hemólisis .....	105
<b>Figura 25.</b> Patisistemas empleados para la evaluación de la actividad biológica de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> para el control de <i>Botrytis cinerea</i> en flor .....	108
<b>Figura 26.</b> Motilidad de <i>Burkholderia</i> sp. M15 y M18 en superficie .....	112
<b>Figura 27.</b> Bovino de la raza Criolla Casanare .....	127
<b>Figura 28.</b> Modelo esquemático del rumen .....	128
<b>Figura 29.</b> Bacterias anaerobias ruminales en fresco .....	129

<b>Figura 30.</b> Bacterias anaerobias ruminales de la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) en microscopía electrónica confocal .....	130
<b>Figura 31.</b> Hongo anaerobio ruminal monocéntrico en microscopía convencional .....	131
<b>Figura 32.</b> Bacterias ácido-lácticas de la CMINA en microscopía electrónica confocal.....	133
<b>Figura 33.</b> Acoples utilizados para la red de gases de CO <sub>2</sub> .....	133
<b>Figura 34.</b> Aguja de gasificación de cánula en acero inoxidable .....	134
<b>Figura 35.</b> Montaje de gasificación para tubos tipo Hungate y Blach .....	134
<b>Figura 36.</b> Cámara anaeróbica usada en la CMINA .....	135
<b>Figura 37.</b> Jarra de anaerobiosis .....	136
<b>Figura 38.</b> Cámara anaeróbica portátil .....	136
<b>Figura 39.</b> Tubo tipo Hungate con tapón de butilo y tapa rosca .....	137
<b>Figura 40.</b> Tubo tipo Blach con tapón de butilo, agrafe y agrafador/ desagrafador .....	137
<b>Figura 41.</b> Procedimiento de transporte de una muestra para su aislamiento .....	140
<b>Figura 42.</b> Crecimiento bacteriano con el método de <i>roll-tube</i> .....	141
<b>Figura 43.</b> Cuantificación de microorganismos anaerobios en tiempo real.....	143
<b>Figura 44.</b> Procedimiento de conservación por congelación .....	145
<b>Figura 45.</b> Esquema de liofilización de bacterias ácido-lácticas (BAL) .....	148
<b>Figura 46.</b> Procedimiento para la conservación por siembra en intervalos .....	149
<b>Figura 47.</b> Determinación de viabilidad según el tipo de microorganismo .....	150
<b>Figura 48.</b> Esquema para la evaluación de BAL .....	151

<b>Figura 49.</b> Esquema para la evaluación de bacterias anaerobias ruminales .....	152
<b>Figura 50.</b> Procedimiento para la tinción de Gram en BAL .....	153
<b>Figura 51.</b> Procedimiento para la prueba de catalasa .....	154
<b>Figura 52.</b> Procedimiento para la prueba de oxidasa .....	154
<b>Figura 53.</b> Determinación de la actividad antagónica de BAL contra <i>Fusarium oxysporum</i> MAP5 .....	155
<b>Figura 54.</b> Tinción de Gram con la modificación de Kopeloff para bacterias anaerobias ruminales .....	157
<b>Figura 55.</b> Evaluación de crecimiento de una cepa de la CMINA .....	158
<b>Figura 56.</b> Conformación de la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) .....	166
<b>Figura 57.</b> Flujo de trabajo de crioconservación a $-80^{\circ}\text{C}$ para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas .....	168
<b>Figura 58.</b> Crioconservación de cepas de <i>Leptospira</i> en nitrógeno líquido, a $-196^{\circ}\text{C}$ , en medio EMJH, con 2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) ...	169
<b>Figura 59.</b> Recuento de <i>Leptospira</i> por microscopía de campo oscuro con la cámara de recuento con profundidad especial .....	170
<b>Figura 60.</b> Microfotografía del efecto citopático (ECP) observado en la línea celular Vero .....	171
<b>Figura 61.</b> Microfotografía del ECP observado en la línea celular BHK-21 .....	171
<b>Figura 62.</b> Flujo de trabajo de liofilización para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas .....	175
<b>Figura 63.</b> Crecimiento de cepas de <i>Leptospira</i> en medio semisólido EMJH y anillo de Dinger .....	176
<b>Figura 64.</b> Microscopía de campo oscuro a 40x; cepa de <i>Leptospira</i> 014 en medio líquido .....	176
<b>Figura 65.</b> Microscopía de campo oscuro a 40x; cepa de <i>Leptospira</i> 014 en medio semisólido .....	177

<b>Figura 66.</b> Mantenimiento de cepas de <i>Leptospira</i> a temperatura ambiente .....	178
<b>Figura 67.</b> Líneas celulares de garrapata con objetivo de 100 × y con microscopio invertido .....	179
<b>Figura 68.</b> Incubación de las líneas celulares IDE8-ISE6 .....	179
<b>Figura 69.</b> Ciclo de vida de las colonias <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	181
<b>Figura 70.</b> Unidad de infestación experimental .....	182
<b>Figura 71.</b> Ubicación anatómica de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> en infestación experimental .....	183
<b>Figura 72.</b> Grupo índice de eficiencia en conversión (IEC) .....	183
<b>Figura 73.</b> Mantenimiento de la fase no parasítica .....	184
<b>Figura 74.</b> Flujo de trabajo para el control de calidad en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	187
<b>Figura 75.</b> Identificación molecular de cepas de <i>Staphylococcus</i> mediante análisis del gen 16S rARN .....	188
<b>Figura 76.</b> Microscopía de tinción de Gram a 100×. ....	190
<b>Figura 77.</b> Pruebas de microbiología convencional de <i>Brucella abortus</i> .....	191
<b>Figura 78.</b> Caracterización molecular de aislamientos de <i>B. abortus</i> de la CMISA .....	192
<b>Figura 79.</b> Identificación molecular de cepas de <i>Streptococcus</i> mediante análisis del gen 16S rARN .....	193
<b>Figura 80.</b> Relación filogenética entre 24 cepas basada en el análisis del gen 16S rARN .....	193
<b>Figura 81.</b> Microscopía de tinción de Gram de la cepa 039 de <i>Lactobacillus</i> a 100×: bacilos Gram-positivos .....	194
<b>Figura 82.</b> Crecimiento del aislamiento patógeno de la cepa 032 de <i>Leptospira</i> en 1M NaCl: presencia de formas esféricas .....	195
<b>Figura 83.</b> Prueba de oxidasa .....	195
<b>Figura 84.</b> Reclassificación taxonómica del género <i>Leptospira</i> , 2019-2020 .....	196

<b>Figura 85.</b> Evaluación de viabilidad de las accesiones de hemoparásitos...	198
<b>Figura 86.</b> Realización y lectura de frotis sanguíneo .....	199
<b>Figura 87.</b> Realización de gota gruesa .....	200
<b>Figura 88.</b> Técnica de Woo .....	202
<b>Figura 89.</b> Sitio web del World Data Centre for Microorganisms (wDCM): <a href="http://www.wdcm.org">www.wdcm.org</a> .....	216
<b>Figura 90.</b> Información suministrada por el wDCM: <a href="http://www.wdcm.org/databases.html">www.wdcm.org/ databases.html</a> .....	217
<b>Figura 91.</b> Página web de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM): <a href="http://www.cchrgm.cl">www.cchrgm.cl</a> .....	218
<b>Figura 92.</b> Catálogo de microorganismos registrados en la CChRGM: <a href="http://www.cchrgm.cl/catalogo-1">www.cchrgm.cl/catalogo-1</a> .....	218
<b>Figura 93.</b> Sitios web de colecciones de cultivos microbianos de Argentina .....	219
<b>Figura 94.</b> Sitio web del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA .....	220
<b>Figura 95.</b> Solicitud de cepas al Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA: <a href="http://www.agrosavia.co/nosotros/bancos-de-germoplasma/contacto">www.agrosavia.co/nosotros/ bancos-de-germoplasma/contacto</a> .....	221
<b>Figura 96.</b> Sistema de información BioloMICS .....	222
<b>Figura 97.</b> Formato GA-F-330: “Pasaporte de accesoión de microorganismos de bancos de germoplasma” .....	224
<b>Figura 98.</b> Simbología asociada al método de conservación del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA .....	229
<b>Figura 99.</b> Modelo de rótulo de accesiones definitivo .....	230

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Caracterización de bacterias de la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB) .....	100
<b>Tabla 2.</b> Caracterización de levaduras de la CMICB .....	101
<b>Tabla 3.</b> Caracterización de hongos filamentosos de la CMICB .....	102
<b>Tabla 4.</b> Evaluación cualitativa del crecimiento .....	104
<b>Tabla 5.</b> Especies del género <i>Bacillus</i> con capacidad hemolítica .....	106
<b>Tabla 6.</b> Referencias para metodologías de autenticación de cepas de la CMICB .....	109
<b>Tabla 7.</b> Clasificación taxonómica de especies del género <i>Bacillus</i> según las características fisicoquímicas evaluadas .....	114
<b>Tabla 8.</b> Medios de cultivo empleados en la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) para el aislamiento de microorganismos ruminales anaerobios .....	139
<b>Tabla 9.</b> Listado de <i>primers</i> utilizados para la identificación de bacterias anaerobias ruminales .....	159
<b>Tabla 10.</b> Perfil bioquímico de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	189
<b>Tabla 11.</b> Perfil bioquímico de <i>Salmonella</i> .....	190
<b>Tabla 12.</b> Código asignado según el tipo de microorganismo .....	227
<b>Tabla 13.</b> Código asignado según la colección .....	228
<b>Tabla 14.</b> Código asignado según el género .....	228
<b>Tabla 15.</b> Código asignado según el consecutivo .....	228
<b>Tabla 16.</b> Ejemplo de identificación (ID) para la generación de códigos QR con accesiones del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA .....	229



## Los autores

Vesícula de hongo formador de micorriza arbuscular (HFMA), CMIB [↑](#)

### Luisa Alejandra Rugeles Barandica

[lruges@agrosavia.co](mailto:lruges@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3364-1974>

Actualmente se encuentra cursando una maestría en Gestión de Proyectos. Profesional de aseguramiento de recursos biológicos del Departamento de Agrobiodiversidad de AGROSAVIA. Especialista en Sistemas Integrados de Calidad, Medio Ambiente y Salud en el Trabajo. Pregrado en Química Industrial.

### Dubert Yamil Cañar Serna

[dcanar@agrosavia.co](mailto:dcanar@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8357-1401>

Ingeniero agroindustrial con maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Coordina el Banco de Germoplasma Vegetal de la Nación Colombiana, disponible en campo, en el contexto de mantenimiento, conservación y bioprospección del recurso biológico del país. Actualmente es investigador máster adscrito a la Red de Cultivos Transitorios y Agroindustriales de AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira.

### Leidy Patricia Tibaduiza Castañeda

[ltibaduiza@agrosavia.co](mailto:ltibaduiza@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9429-063X>

Magíster en Antropología Social de la Universidad de los Andes. Especialista en Desarrollo Rural de la Universidad Nacional de Colombia. Licenciada en Psicología y Pedagogía de la Universidad Pedagógica Nacional. Pasante de posgrado en el Centro Cultural Poveda, República Dominicana. Experiencia en creación y fortalecimiento de redes rurales, diseño de cualificaciones para el sector agropecuario, procesos de sistematización de experiencias, docencia universitaria y evaluación ambiental y cambio climático. Habilidades para el

trabajo interdisciplinar y el diseño, así como para la gestión, ejecución y evaluación de proyectos. Actualmente, es investigadora máster adscrita a la Red de Cultivos Transitorios y Agroindustriales de AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá.

### Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

[hjimenez@agrosavia.co](mailto:hjimenez@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7277-8132>

Biólogo de la Pontificia Universidad Javeriana con doctorado en Agricultura de la Universidad de Aberystwyth, UK. Ha trabajado en microbiología anaerobia, en particular con hongos anaerobios del rumen. Este grupo inusual de hongos, que habitan en el tracto digestivo de los herbívoros salvajes y domésticos, participan en la degradación del alimento ingerido por los animales. Adicionalmente, su reciente interés es el trabajo de bioprospección de microorganismos involucrados en los procesos de conservación de forrajes, en particular en el desarrollo de inoculantes de ensilado. En la actualidad, se encuentra encargado de la coordinación de recursos biológicos en AGROSAVIA, la cual consiste en los bancos animal, vegetal y de microorganismos.

### Carolina González Almario

[cgonzaleza@agrosavia.co](mailto:cgonzaleza@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8596-3751>

Ph. D. en Biología de la Universidad de Perpignan y máster en Biología y Adaptación de Plantas de la Universidad de Montpellier III. Bióloga de la Universidad de los Andes. Actualmente es investigadora Ph. D. asociada y jefe del Departamento de Agrobiodiversidad de AGROSAVIA. En su trayectoria ha tenido posiciones destacadas como *postdoc* en el Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, así como profesora de cátedra en Microbiología, en la Universidad Militar Nueva Granada, programa de Biología Aplicada. Su trabajo de investigación se centra actualmente en recursos genéticos e interacción planta-patógeno benéfico.

### German A. Estrada-Bonilla

[gaestrada@agrosavia.co](mailto:gaestrada@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8742-5957>

Investigador en el área de microbiología de suelos en AGROSAVIA y representante de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología (ALAR) en Colombia. Ph. D. en Agronomía (Suelos y Nutrición de Plantas) de la Escuela Superior

de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo. Máster en Ciencias Agropecuarias (Fitotecnia) de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro y microbiólogo de la Pontificia Universidad Javeriana. Desarrolla proyectos en el área suelo-microorganismo-planta-ambiente, para mejorar la eficiencia de la fertilización y modular la respuesta de los cultivos al estrés abiótico. Tiene experiencia en el uso de PGPB y residuos orgánicos en cultivos agroindustriales. Su objetivo es mejorar la competitividad de la agricultura en Colombia, a través de la microbiología del suelo como eje de innovación.

### Ruth R. Bonilla Buitrago

[rbonilla@agrosavia.co](mailto:rbonilla@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2542-0194>

Ph. D. en Ciencias Agrícolas y máster en Química Agrícola de la Universidad de Agricultura de Varsovia. Licenciada en Química y Biología de la Universidad de La Salle. Actualmente es investigadora Ph. D. senior de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Líder del grupo Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Ha formulado y desarrollado proyectos de investigación y transferencia nacionales e internacionales en el área de biofertilización. Tiene sesenta publicaciones en revistas de alto impacto. Ha generado productos para el sector agropecuario: Monibac® y el Álbum Élite de microorganismos caracterizados fenotípica y genéticamente. Ha contribuido con la formación de recursos humanos a nivel de pregrado, maestría y doctorado. Revisora de revistas científicas de Springer y Frontiers. Integrante del Comité Científico de Porkcolombia.

### Paola J. Criollo-Campos

[pcriollo@agrosavia.co](mailto:pcriollo@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8623-2536>

Bióloga de la Universidad del Tolima. Estudiante de maestría en Ciencias Ambientales en la Universidad Jorge Tadeo Lozano. En la actualidad se desempeña como profesional de apoyo a la investigación en el Banco de Germoplasma de Microorganismos, adscrito a la Red de Innovación de Ganadería en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. Con amplia experiencia en el aislamiento, la conservación y la descripción de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, tipo rizobios, y la determinación enzimática de parámetros de calidad del suelo. Se encuentra capacitada en la formulación y ejecución de proyectos de investigación enfocados en mejorar las condiciones del agro colombiano.

## Urley A. Pérez-Moncada

[uperez@agrosavia.co](mailto:uperez@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3069-3237>

Máster en Ciencias Biológicas e ingeniero de producción biotecnológica. Actualmente es investigador máster de AGROSAVIA, en la línea de investigación en microbiología de suelos, hongos formadores de micorrizas arbusculares y nutrición de plantas.

## Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez

[luribe@agrosavia.co](mailto:luribe@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8282-7196>

Investigadora máster de AGROSAVIA. Microbióloga egresada de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá y, posteriormente, de la Maestría en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia. Hace parte del grupo de curadores de la Colección de Microorganismos de AGROSAVIA. Cuenta con experiencia en la conservación y caracterización de microorganismos como bacterias y hongos con interés en control biológico desde 2012. Sus investigaciones se han enfocado en la selección y caracterización de agentes microbianos con potencial de uso en el sector agropecuario.

## Jennifer Lorena García Riaño

[jgarcia@agrosavia.co](mailto:jgarcia@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8991-4842>

Profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA. Microbióloga egresada de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá y actualmente estudiante de maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Colombia. Hace parte del grupo de curadores de la Colección de Microorganismos de AGROSAVIA. Sus investigaciones han sido enfocadas en procesos de aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos, con un interés en el control biológico, la producción masiva y la formulación de bioproductos. Asimismo, tiene experiencia en la conservación, mantenimiento y estudios de viabilidad de la Colección de Microorganismos desde 2017.

## Carol Viviana Amaya Gómez

camaya@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1881-7604>

Microbióloga de la Pontificia Universidad Javeriana, con maestría en Investigación y Avances en Microbiología y Ph. D. con énfasis en microbiología de la Universidad de Granada, España. Durante su carrera de investigación ha trabajado en la Estación Experimental del CSIC, en España; la Universidad de California en Los Ángeles, EE. UU.; la Universidad de Warwick, Inglaterra, y la Universidad de Ciencias Agrarias de Suecia. Desde 2015, es investigadora Ph. D. del Centro de Investigación La Libertad, de AGROSAVIA. Entre sus intereses de investigación se encuentra la caracterización fisiológica y molecular de microorganismos con potencial biotecnológico. Cuenta con publicaciones en revistas científicas y participa en proyectos enfocados en la bioprospección de microorganismos de la colección de control biológico del BGMA.

## Fernando Rodríguez Villamizar

frodriguez@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3798-1717>

Ph. D. en Microbiología de la Universidad Estatal de Iowa (EE. UU.). M. Sc en Biología. Licenciado en Biología y Química. Investigador Ph. D. asociado de AGROSAVIA. Tiene experiencia en la identificación y el estudio molecular de microorganismos en su entorno (ecología molecular microbiana), fisiología microbiana y desarrollo de probióticos para la industria animal. Ha recibido formación en biopelículas y microarreglos en la Universidad de Harvard, así como en filogenia y taxonomía molecular microbiana en el Staff - Institute de Japón. Actualmente es profesor invitado de Biología Molecular en la Universidad Militar y la Universidad de Córdoba. Mantiene una activa cooperación científica y académica con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-USA) y la Colección de Microorganismos y Células de Alemania (DSMZ-Alemania).

## Rocío Fenney Herrera León

rherrera@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6258-5476>

Zootecnista. Profesional de apoyo en AGROSAVIA, Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal. Experiencia en el manejo y curaduría de microorganismos como bacterias y hongos anaerobios estrictos y bacterias facultativas, así como en el desarrollo de diferentes técnicas que permitan

realizar su caracterización y posible uso agroindustrial. Conocimiento en el manejo de herramientas moleculares como la proteómica para la determinación de perfiles electroforéticos de diferentes matrices.

### Juan Camilo Ovalle Másmele

[jovallem@agrosavia.co](mailto:jovallem@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7024-0849>

Profesional de Planeación y Cooperación Institucional de AGROSAVIA. Anteriormente, profesional de apoyo a la investigación, adscrito a la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal en la misma entidad. Bacteriólogo con énfasis en microbiología ambiental. Estudios en Gerencia de Calidad de Laboratorios, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Máster en Administración Pública de la Escuela Superior de Administración Pública (ESAP). Actualmente, trabaja en gestión de conocimiento y extensión agropecuaria con las plataformas de soporte al SNIA, Siembra, Linkata y BAC.

### Lina Marcela Botero Rute

[lmbotero@agrosavia.co](mailto:lmbotero@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6900-8495>

Profesional de apoyo a la investigación de AGROSAVIA. Microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Máster en Diseño y Gestión de Procesos con énfasis en bioprocesos de la Universidad de La Sabana. Curadora de la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA), con enfoque en aislamiento, conservación e identificación de bacterias anaerobias ruminales y bacterias anaerobio-facultativas, además del uso de técnicas independientes de cultivo para su caracterización. Parte del grupo de Bioprospección de Biomoléculas y Microorganismos con Aplicaciones Agropecuarias, reconocido por Colciencias.

### María Camila Rengifo Ibáñez

[mrenjifo@agrosavia.co](mailto:mrenjifo@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6350-5554>

Ph. D. en Medicina Tropical del Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM), Universidad de Liverpool. Bióloga de la Pontificia Universidad Javeriana. Tiene experiencia en principios de vacunología reversa, diseño de inmunógenos multiepítope a partir de proteínas hipervariables de venenos de serpientes, diversas técnicas de inmunización murina, generación de anticuerpos mono y policlonales contra *targets* específicos y técnicas inmunoinformáticas para la

predicción de epítopes a partir de antígenos inmunodominantes en procesos de infección al huésped para su neutralización. Su investigación en AGROSAVIA se enfoca en la implementación de vacunología reversa para el diseño y desarrollo de biológicos preventivos, terapéuticos y de diagnóstico para enfermedades de interés en sistemas de producción animal. Actualmente lidera el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Salud Animal.

### Sabrina del Carmen Jiménez Velásquez

[sjimenez@agrosavia.co](mailto:sjimenez@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6707-4491>

Máster en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Microbióloga. Investigadora máster de AGROSAVIA. Curadora de la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal, con enfoque en identificación y caracterización de atributos potenciales de patogenicidad en microorganismos mediante técnicas o herramientas fenotípicas, biología molecular, proteómica, cultivo *in vitro* celular e inmunoproteómica. Está vinculada al grupo de investigación Bioprospección de Biomoléculas y Microorganismos con Aplicaciones Agropecuarias y al Grupo de Investigación e Innovación en Salud y Bienestar Animal, reconocidos por Colciencias.

### Ligia Denise Torres Higuera

[ltorres@agrosavia.co](mailto:ltorres@agrosavia.co)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2731-6529>

Bacterióloga y laboratorista clínica, egresada de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA. Realiza actividades en la Colección del Banco de Germoplasma de Microorganismos para la Alimentación y la Agricultura con Interés en Salud Animal y otros proyectos de investigación enfocados en la identificación y caracterización de atributos potenciales de microorganismos patógenos de impacto en los sistemas de producción pecuaria, mediante herramientas de microbiología convencional, biología molecular, inmunoproteómica y cultivo celular. Forma parte del grupo de investigación de Bioprospección de Biomoléculas y Microorganismos con Aplicaciones Agropecuarias y del Grupo de Investigación e Innovación en Salud y Bienestar Animal, reconocidos por Colciencias.

## Óscar Gabriel Beltrán

ogbeltran@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1026-7177>

Bacteriólogo y laboratorista clínico. Profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA.

## David Emigdio López Ardila

dlopeza@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5326-1402>

Médico veterinario. Especialista en Laboratorio Clínico Veterinario. Profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA, vinculado a la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal de Ectoparásitos y Hemoparásitos, que forma parte del Banco de Germoplasma de Microorganismos. Perfil dirigido al mantenimiento, evaluación de la viabilidad y caracterización de la colección mediante técnicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Vinculación vigente al grupo de investigación de Bioprospección de Biomoléculas y Microorganismos con Aplicaciones Agropecuarias y al Grupo de Investigación e Innovación en Salud y Bienestar Animal, reconocidos por Colciencias.



## Agradecimientos

Línea celular de garrapata ISE6 *Ixodes scapularis*, CMISA ↑

La Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes (CMIB) agradece a la Dra. Margarita Ramírez por sus el trabajo realizado durante la conformación y coordinación de los Bancos de Germoplasma de Microorganismos, igualmente por los aportes específicos en esta colección en pro de potenciar su uso como principio activo para la generación de biofertilizantes, así como su empleo en estrategias de nutrición de plantas y promoción de crecimiento. Agradece igualmente a las profesionales e investigadoras Liliana Tovar, Ana María Serralde, Catalina Santana, Patricia Urdaneta, Lina Margarita Moreno, Aura Marina Reyes, Wilmar Wilches y Mauricio Camelo, por su compromiso durante el tiempo que participaron en las actividades de conservación, caracterización y documentación de esta colección.

La Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB) agradece a la Dra. Alba Marina Cotes Prado por la iniciativa de conformar una colección de microorganismos con actividad biocontroladora sobre patógenos y plagas de importancia agrícola. Asimismo, por mantener la visión de utilizar este material biológico como principio activo de bioinsumos, que pueden ser incorporados como estrategias de manejo integrado (MIIP) y como alternativas para incrementar la productividad agrícola de manera más amigable con el ambiente. Se resalta su iniciativa de formalizar el acceso y uso de microorganismos del Banco con fines de investigación e implementar un sistema de información especializado para sistematizar los datos de pasaporte y caracterización de los microorganismos que conforman las colecciones del Banco de Germoplasma. La colección agradece igualmente a los investigadores Olga Pérez, Jimmy Zapata, Andrés Díaz, Lissette Torres, Camilo Beltrán, Leonardo Sastoque, Carlos Espinel, Magda García, Adriana Santos, Cindy Mejía, Lorena García, y a todo el grupo de Control Biológico de Plagas Agrícolas, por sus contribuciones al desarrollo de actividades de colecta, incremento, caracterización y documentación.

La Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) agradece a los investigadores pioneros que, con su exploración y dedicación, propendieron por la conservación y estudio de las cepas de microorganismos ruminales: Jorge Alberto Rodríguez, Elizabeth Martín Martínez, Carolina Laverde, Solains Cañón, Fredy Orlando Carvajal, Tatiana Alejandra Rodríguez, Sonia Yanira Rodríguez, Carlos Augusto Ospina, Diego Javier Jiménez y Carolina Díaz. Adicionalmente, nuestra gratitud a dos visionarios que le apostaron a la bioprospección y construcción de un banco de germoplasma de microorganismos ruminales con interés en nutrición animal: Tito Efraín Díaz y Germán Afanador Téllez.

La Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) agradece la iniciativa de la Dra. Alba Marina Cotes Prado, en colaboración con investigadores del programa de Salud Animal de AGROSAVIA, doctores Manuel Isaac Gallego, Pilar Donado, Juan Fernando Gallego, Esperanza Cortés, Efraín Benavides, Rocio Esperanza Patiño Burbano, José Luis Rodríguez y Ligia Denise Torres Higuera, por su propósito de conformar una colección de microorganismos con interés en salud animal que pudieran ser empleados como material de referencia para diferentes proyectos de investigación en medicina veterinaria y para estudios epidemiológicos que permitieran la prevención y el control de enfermedades con alto impacto tanto en el sector pecuario del país como en salud pública.

Agradecimientos muy especiales a todos los profesionales que mediante su dedicación y conocimiento sacaron adelante este proyecto, manteniéndolo a lo largo del tiempo, pues brindaron para este documento sus conocimientos sobre la adecuada conservación y caracterización del material biológico de la nación colombiana.



# Prólogo

*Alternaria* sp., CMICB ↑

Nos complace, como miembros de la comunidad científica de AGROSAVIA y como responsables de los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura —que son patrimonio colombiano—, presentar este libro, con el que pretendemos acercar a la comunidad de investigadores de AGROSAVIA, a la comunidad científica y a la población colombiana al conocimiento de los recursos genéticos microbianos que se conservan en estos bancos.

Este libro, que fue realizado por investigadores que han dedicado gran parte de su tiempo a la evaluación, ajuste y diseño de metodologías de conservación de microorganismos con interés agrícola y pecuario, recoge los desarrollos más importantes de los últimos 25 años de trabajo. Como resultado de la conservación de esta biodiversidad microbiana, hoy en día estas colecciones son la información esencial para el desarrollo de la investigación científica y la oferta tecnológica sobre el tema, en busca del fortalecimiento de la seguridad alimentaria del territorio nacional.

Esta obra es el resultado de la colaboración de varios autores, todos ellos especialistas en los distintos grupos taxonómicos que conforman las colecciones microbianas. En el primer capítulo, que abarca el contexto de los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura, se esboza la historia del sistema de bancos de germoplasma, que conserva la agrobiodiversidad del país. El segundo capítulo describe, de manera general, las condiciones de conservación y autenticación de los microorganismos conservados en estas colecciones. Los capítulos 3-6 se relacionan, respectivamente, con la conservación de los microorganismos con interés en biofertilizantes (bacterias y hongos formadores de micorrizas arbusculares), en control biológico (bacterias, levaduras y hongos filamentosos), en nutrición animal (bacterias y hongos anaerobios) y en salud animal (bacterias, virus, ectoparásitos y hemoparásitos). Finalmente, el séptimo

capítulo toca todo lo relacionado con la documentación de la información de los bancos.


El trabajo realizado con los curadores y responsables de los Bancos de Germoplasma de Microorganismos durante estos cuatro años nos permite aseverar que no existe un documento sobre estos temas que contenga todo lo que aquí se desarrolla; de esta manera, si el lector está buscando un material de referencia obligatorio, este libro es el indicado.

**Carolina González Almario**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE AGROBIODIVERSIDAD

**Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal**

COORDINADOR DE RECURSOS BIOLÓGICOS



# Introducción

Larva de garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus*, CMISA ↑

Las recientes amenazas biológicas provenientes de la naturaleza han puesto en riesgo la salud humana y animal y, de esta manera, han dejado en evidencia que la sociedad no está preparada para responder eficientemente a su prevención y control. Tardó más de una década descubrir un nuevo antimicrobiano de amplio espectro —la halicina— que ejerciera una efectiva acción antibiótica contra *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii* y otros enteropatógenos resistentes a carbapenems. Para el diseño de la halicina, se combinaron las tecnologías de frontera *machine learning* y *neural biology*, con las cuales se alimentaron algoritmos con miles de estructuras de moléculas con reconocida actividad antimicrobiana. Estos algoritmos filtraron y seleccionaron nuevas candidatas según su estructura y orden atómico, para generar nuevas estructuras que fueron tomadas y probadas, en ensayos *in vitro* e *in vivo*, contra patógenos de importancia vegetal, animal y humana. En la actualidad, más del 80 % de los antimicrobianos hasta hoy conocidos han sido identificados, aislados y sintetizados a partir de los microorganismos presentes en diferentes ecosistemas y nichos ecológicos. Es natural que muchas de las bacterias y hongos habitantes de diversos ecosistemas compitan por nutrientes y espacios de colonización, ya que estos son limitados, y para hacerlo apelan a su arsenal antimicrobiano o a su comportamiento como comunidad celular, lo que les facilita a algunos la agregación y multiplicación, y esto les permite trabajar como comunidades bioquímicamente inteligentes, conocidas como “biopelículas”.

Las armas de confrontación antimicrobiana van desde moléculas de naturaleza siderófora, que capturan el hierro u otros microelementos limitantes, hasta compuestos que generan porinas no selectivas, que permiten desestabilizar el flujo de iones hacia fuera y hacia dentro de la célula; esta es, entre otras, la excepcionalidad y punto diferencial de la halicina en relación con otros antimicrobianos: su capacidad de irrumpir en el flujo normal de salto de electrones a través de la membrana, generando una caída de la fuerza protón-motriz de las membranas celulares y de su flujo normal de electrones.

Las regiones del trópico, cargadas de ambientes altamente diversos, podrían teóricamente guardar niveles similares de diversidad microbiana, aunque esto aún no ha sido comprobado; se asume, entonces, que el territorio colombiano cuenta con microorganismos distintos, y aunque no se tiene total certeza sobre esto, es obvia su diversidad funcional, ya que, por sus condiciones de clima y de presión biótica y abiótica, sus hospederos y congéneres en microambientes demandan diferenciación metabólica. A pesar de los avances tecnológicos de la última década, ni los mejores microbiólogos y bacteriólogos del mundo han logrado cultivar siquiera más del 3 % de los microorganismos existentes en el planeta, lo cual no minimiza la importancia de los recursos biológicos microbianos cultivados y presentes en los bancos y colecciones microbianos del país y del mundo; por el contrario, esta pequeña fracción cultivable es un tesoro biológico, y su estudio y caracterización podría develar nuevas moléculas con aplicación en campos como la salud, la alimentación, la biorremediación y la industria en todos los niveles.

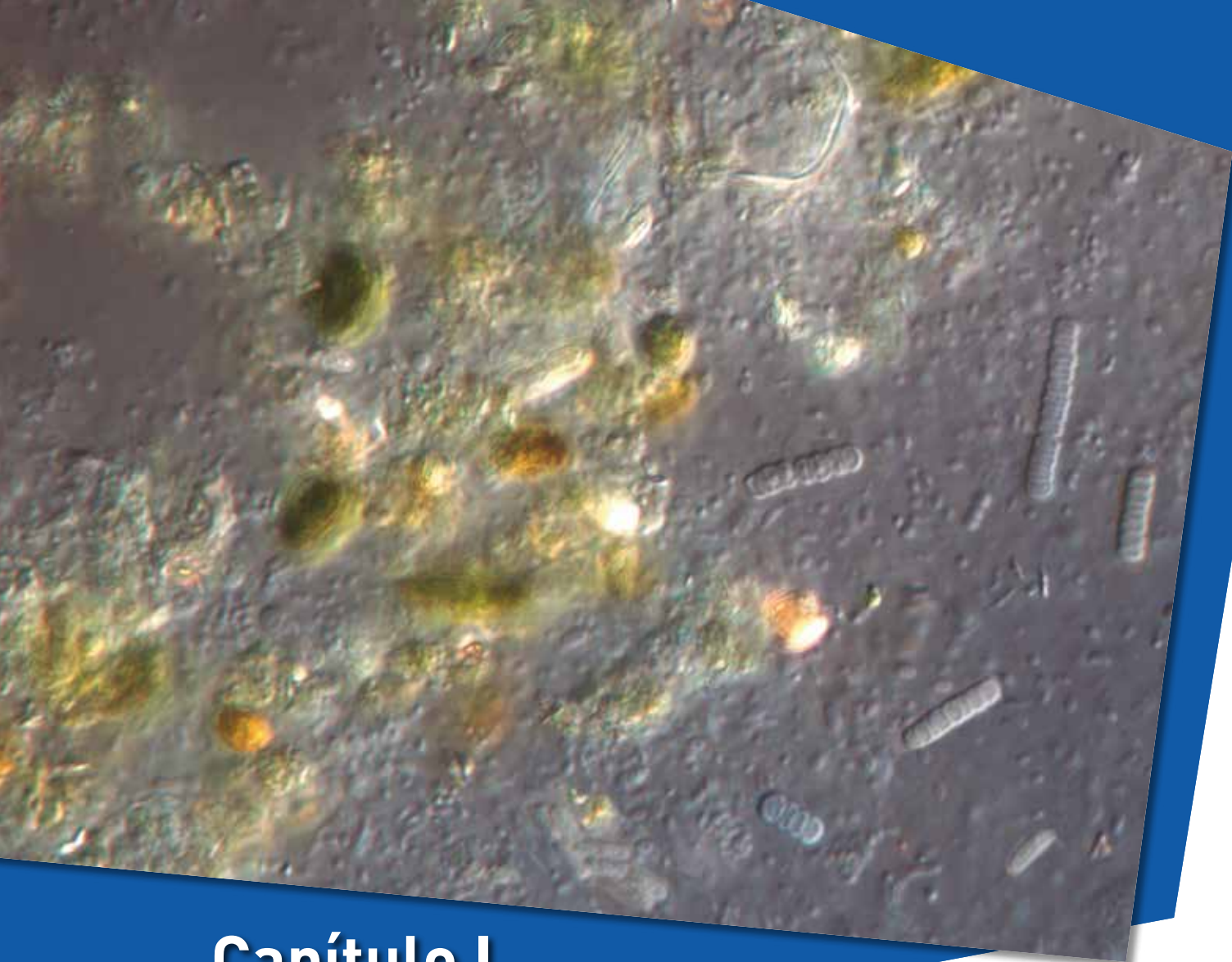
En Colombia, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) mantiene los bancos y colecciones microbianos con importancia en agricultura y alimentación. Este repositorio, ejemplo de nuestra diversidad, representa el presente y el futuro de nuestras mejores herramientas para prevenir y controlar los patógenos que afectan a las plantas y los animales con importancia económica. Este documento científico, elaborado por los actuales curadores de este recurso genético, representa un manual de acción para aislar, conservar y caracterizar organismos y microorganismos con potencial uso en agricultura y alimentación. Basados en múltiples investigaciones para develar el acervo genético y metabólico asociado, estos investigadores brindan a la academia y a la industria las herramientas experimentales para la protección de esta biodiversidad y para su uso en procesos de producción de diversos sectores de la agroindustria.

Esta publicación tiene el propósito de revisar uno de los aspectos más importantes de la agrobiodiversidad: las colecciones de microorganismos. En este concepto de *agrobiodiversidad*, los microorganismos son organismos vivos ubicuos, con una enorme versatilidad metabólica y fisiológica, capaces de participar activamente en casi todos los ciclos bioquímicos, dentro de los cuales están aquellos que atañen a los sistemas productivos y otros relacionados directamente con el bienestar y la salud de los humanos.

Muchos componentes clave de la biodiversidad microbiana están disminuyendo, por lo que es necesario mejorar los conocimientos, particularmente en los procesos de conservación de esta biodiversidad y en su función individual o en los ecosistemas. Esto es posible con el uso de metodologías, prácticas y enfoques de investigación que permitan su conservación *ex situ* con estándares de curaduría especializada que garanticen su viabilidad. Lo anterior servirá para promover su uso a través de caracterizaciones que permitan identificar los atributos de valor para investigación en bioprospección y generación de bioproductos, entre otros.

En la búsqueda de nuevos microorganismos, genes y metabolitos, muchos investigadores enriquecen las colecciones con una gran cantidad de especímenes de la biodiversidad del país; sin embargo, este esfuerzo muchas veces se ve rezagado por las limitaciones en los recursos, las metodologías y la experiencia que poseen los investigadores. Ante esta necesidad, AGROSAVIA realizó la segunda versión del Curso Internacional de Conservación y Manejo de Colecciones Microbianas, que permitió a los participantes apropiarse de herramientas y estrategias para garantizar la viabilidad, pureza y autenticidad de los diferentes microorganismos que son actualmente conservados en las colecciones de trabajo y en el Banco de Germoplasma de Microorganismos del país. Con lo anterior, muchas personas tuvieron la oportunidad de acceder a esta información, aunque se reconoce que aún hace falta más trabajo para complementar esta iniciativa.

La publicación de este libro no hubiera sido posible sin la participación de todos los especialistas en los procesos de conservación de microorganismos, y particularmente de los curadores de las colecciones microbianas con interés en biofertilizantes, control biológico, nutrición animal y salud animal.



# Capítulo I

Microorganismos anaerobios del rumen; muestra de fluido ruminal, CMINA ↑

28

## Contexto de los Bancos de Germoplasma para la Alimentación de la Nación Colombiana

Carolina González Almario  
Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal  
Luisa Alejandra Rugeles Barandica  
Dubert Yamil Cañar Serna  
Leidy Patricia Tibaduiza Castañeda

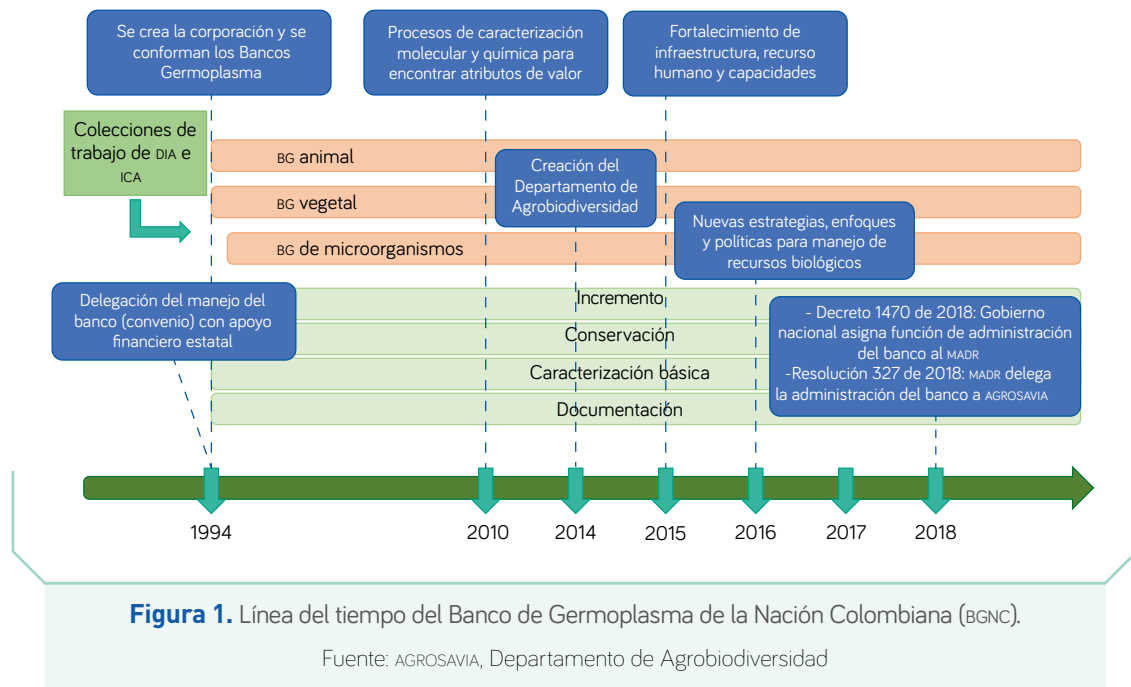
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

Autora de correspondencia: Carolina González Almario; correo electrónico: [cgonzaleza@agrosavia.co](mailto:cgonzaleza@agrosavia.co)

Los antecedentes de los Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana (BGNC) se remontan a los finales de los años treinta, cuando se estableció la política de recursos genéticos, e institucionalmente, a mediados de los años cuarenta, se dio lugar al registro de las primeras colectas en libros de campo y se crearon las colecciones de papa y maíz. En este contexto, antes de 1992, los recursos genéticos eran considerados patrimonio de la humanidad, lo cual permitía su intercambio y uso sin restricciones. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 1992), esto cambió luego de la promulgación del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), difundido en 1992, en el cual la ONU reconoció la soberanía de las naciones sobre sus recursos genéticos (Hammer et al., 2003), con lo cual finalizó el intercambio sin restricciones de agrobiodiversidad entre los Estados del mundo.

En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, conocida también como la Cumbre de la Tierra, llevada a cabo en Río de Janeiro en 1992, se discutió la necesidad de las naciones de tener un equilibrio entre los ámbitos económico, social y ambiental. En esta conferencia se proclamó la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, que permitió establecer una definición más clara del concepto de *desarrollo sostenible*, y se aprobó la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, a partir de la cual se desprendió la firma, en 1997, del Protocolo de Kioto (Bonell Colmenero, 2007). La Cumbre de la Tierra también dio lugar a la Declaración de los Principios Relativos a Bosques y al CDB, que incluye “la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos” (ONU, 1992).

En 1994, el Gobierno colombiano facilitó la conformación del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación para la Alimentación y la Agricultura (SBGNAA), a partir de las colecciones existentes en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). En el mismo año, se crea la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica, actualmente AGROSAVIA), a la que se le delegó la responsabilidad de administrar los bancos de germoplasma; allí, se reconocen como hitos 1) el establecimiento del Sistema de BGNC, así como de los programas de investigación en recurso genético tanto vegetal como animal, donde se incorporaron tres colecciones *in vitro* en plátano, batata y papa criolla; 2) la incorporación de las colecciones de microorganismos a las colecciones del BGNC, y 3) el inicio de las caracterizaciones y la regeneración de materiales, además de nuevas colectas, la selección de bancos principales y satélite y el inicio del sistema de producción de semilla vegetal (figura 1).



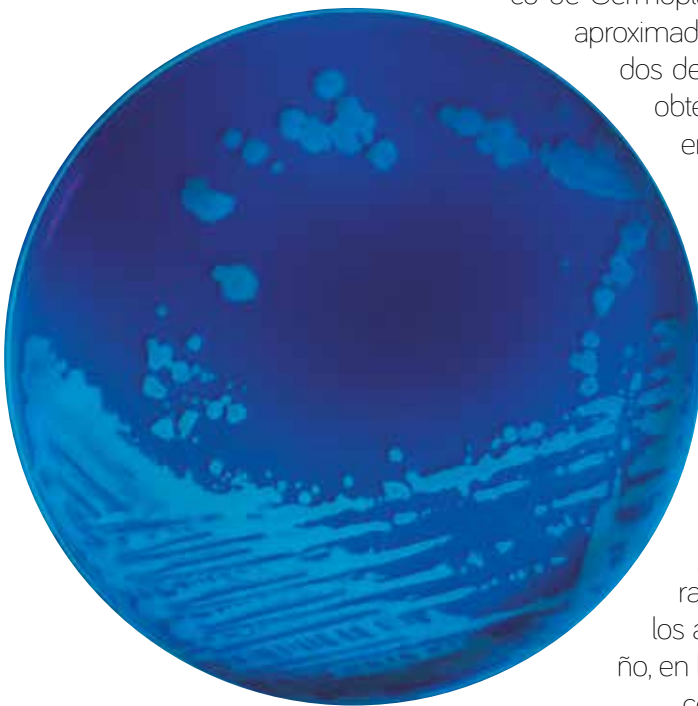
A nivel regional, a finales de los noventa y a inicios del nuevo milenio, la Comunidad Andina de Naciones (CAN) estableció políticas y estrategias para garantizar el desarrollo sostenible de la región, por lo que dio lugar a la Decisión 523 de 2002 (CAN, 2002), respecto a la Estrategia Regional de Biodiversidad para los Países del Trópico Andino. En este contexto sociopolítico, se dio el redimensionamiento del BGNC para la producción de semilla, almacenable en el Centro de Investigación Tibaitatá, ubicado en Mosquera, Cundinamarca, y para guardar copias en el CI La Selva, localizado en Llanogrande, Antioquia. Así, con la colaboración de la Universidad de Córdoba, se recuperaron materiales de la colección de vid y se dio lugar a nuevas colecciones de agraz, mortiño, higuerrilla y caña flecha; asimismo, se dio de baja la colección de caducifolios. En el último decenio, se ha venido trabajando en el BGNC en el dimensionamiento de su valor de existencia, valor de opción y valor de uso.

## Los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en la actualidad

En los BGNC se conciben los recursos genéticos de acuerdo con su valor de existencia, valor de opción y valor de uso. Se adquiere valor de existencia cuando se conserva la agrobiodiversidad nativa o foránea utilizada en sistemas agropecuarios sostenibles y eficientes para afrontar los retos del cambio climático y la seguridad alimentaria, entre otros. Por otro lado, los recursos conservados ganan valor de opción cuando se conoce la variabilidad presente en ellos, pero se deben determinar también los atributos de valor, con lo cual se identifican marcadores relacionados con características importantes y se reconocen comportamientos ecofisiológicos para promover su uso como fuente importante para el desarrollo de variedades, cultivares, razas y bioproductos. Una vez identificados los atributos de valor y su potencial, estos recursos genéticos podrán ser utilizados en agroecosistemas integrales o para el desarrollo de bioproductos. De este modo, los recursos genéticos en conservación adquieren valor de uso.

Desde esta perspectiva, el Sistema de BGNC engloba los bancos de germoplasma vegetal, animal y de microorganismos (figura 2). En la actualidad, el Banco de Germoplasma Vegetal conserva 34.100 accesiones, aproximadamente, entre las que se incluyen duplicados de 76 especies o grupos de ellas que fueron obtenidas hasta 2010 y que están disponibles en los ci La Selva, Tibaitatá, La Suiza, Caribia, Turipaná, El Nus, La Libertad, Palmira, Nataima, El Mira y Obonuco. De este modo, el Banco de Germoplasma Vegetal apoya los procesos de investigación y los sistemas productivos agrícolas del país.

El Banco de Germoplasma Animal incluye razas criollas o naturalizadas y cuenta con los núcleos bovinos Romosinuano, Costeño con Cuernos, Blanco Orejinegro y Sanmartinero, con ovinos de las razas criolla y Mora y con porcinos criollos de los acervos Zungo, Casco de Mula y Sanpedreño, en los ci Turipaná, La Libertad, Palmira, Obonuco y El Nus (Vásquez Romero et al., 2000). Adicionalmente, como apoyo a los procesos



↑ *Pseudomonas fluorescens*, CMIB

de conservación y como herramienta para la multiplicación de razas criollas, se creó en 1994 un banco de germoplasma *in vitro*, conformado por semen y embriones de todas las razas criollas existentes en Colombia, que están conservadas y disponibles en el CI Tibaitatá (AGROSAVIA, 2019).

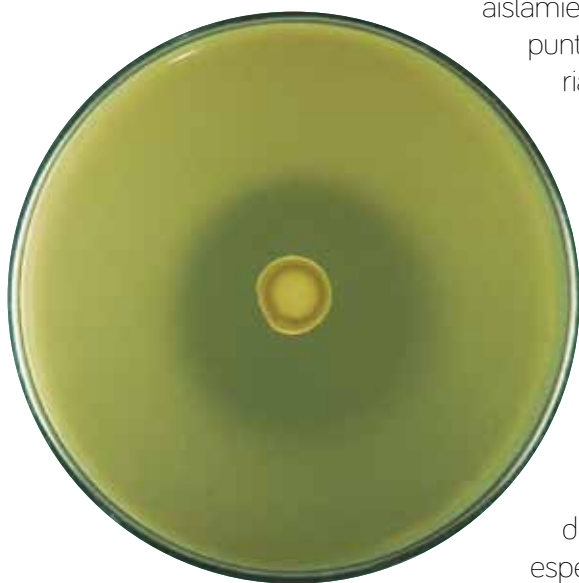
Finalmente, el Banco de Germoplasma de Microorganismos cuenta con cuatro colecciones diversas, las cuales incluyen microorganismos de interés en nutrición animal, control biológico, biofertilizantes y salud animal. La importancia de la primera colección deriva de su potencial para la nutrición animal, pues aporta a procesos de investigación para la obtención de probióticos —un ejemplo de ello es Rumitec—, así como de su uso bioindustrial para la degradación de desechos orgánicos lignocelulósicos y la producción de combustibles de segunda y tercera generación. Los microorganismos de la segunda colección tienen un gran potencial para el biocontrol de insectos considerados como plagas y también actúan sobre microorganismos fitopatógenos; además, varios de ellos ya han demostrado su eficacia, como es el caso de Tricotec. La tercera colección ha permitido la producción y registro de biofertilizantes a partir de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno; ejemplos de estos biofertilizantes son Rhizobiol, Monibac o bioproductos elaborados a partir de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), como el Mycobiol, que está constituido por cepas puras seleccionadas de los cultivos de uchuva, caña panelera, especies forestales, especies hortícolas y frutales (AGROSAVIA, 2019). Por último, la colección de salud animal es única en el país y

cuenta con cepas de referencia internacional, así como con aislamientos nacionales o nativos, los cuales, desde el punto de vista genético, forman parte de un material base para el estudio de diversas enfermedades en animales, además de que son de interés epidemiológico y de salud pública.

### Aspectos normativos

Las cuatro colecciones del Banco de Germoplasma de Microorganismos están debidamente registradas ante el Registro Nacional de Colecciones (RNC), que permite consolidar y divulgar la información básica sobre estas colecciones, patrimonio del país, y además facilita la movilización de especímenes en el territorio nacional, por lo que actúa como salvoconducto. La importancia de este

32



Antagonismo BAL vs. *E.coli* O157:H7, CMINA ↑

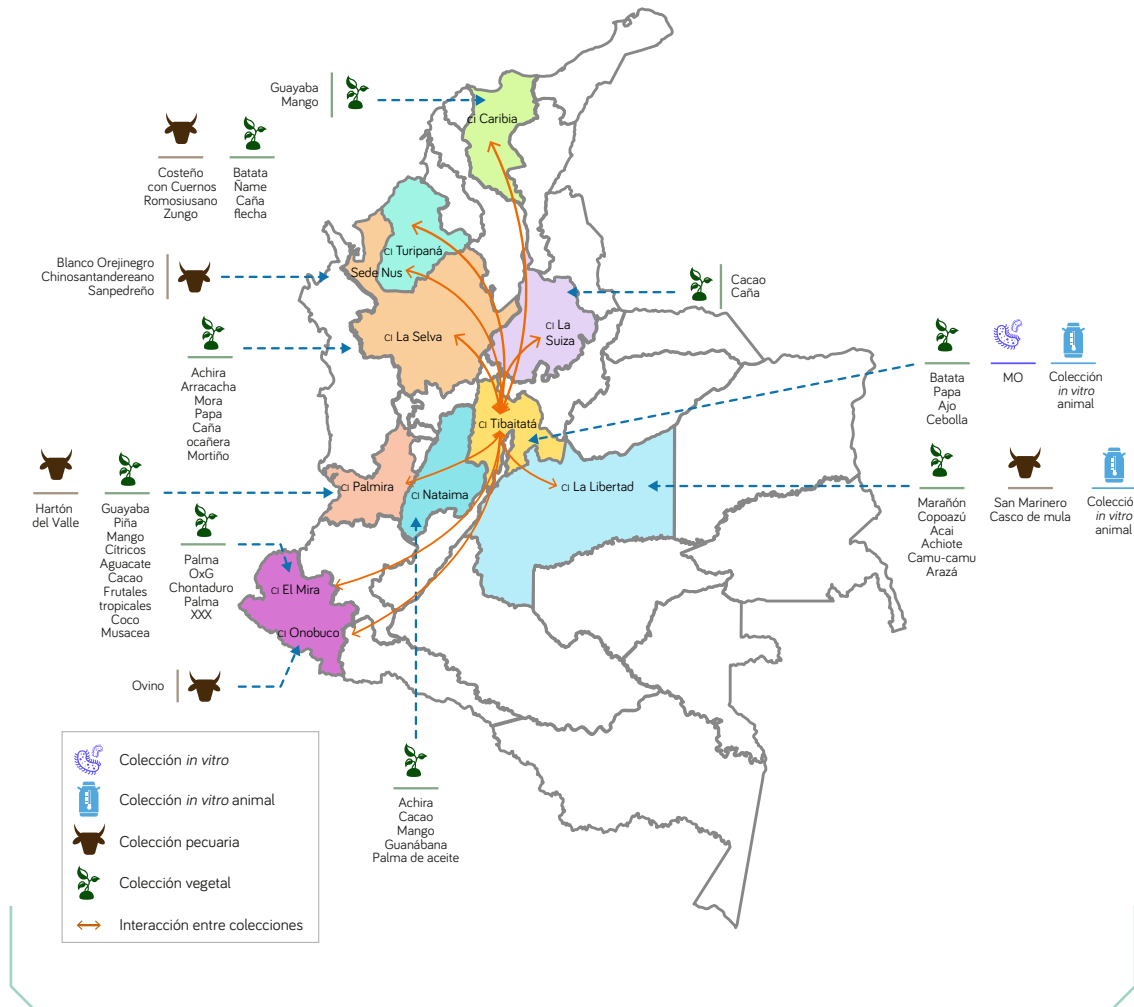


Figura 2. Mapa actual del BGNC.

Fuente: AGROSAVIA (2019)

registro radica en la posibilidad de visibilizar y hacer accesibles y disponibles estas colecciones al público general, con fines de investigación.

En la actualidad, AGROSAVIA cuenta con un permiso marco de recolección que les permite a sus investigadores, así como a los curadores del Banco de Germoplasma de Microorganismos, recolectar especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial en temas de sistemática molecular, ecología molecular, evolución y biogeografía molecular, así como incrementar la diversidad y variabilidad de las colecciones que lo conforman.

## Formación y divulgación a partir del fortalecimiento de capacidades técnico-científicas

Las colecciones microbianas representan un pilar fundamental en la conservación de la diversidad biológica y, además, son fuente primaria para investigaciones básicas relacionadas con el funcionamiento de los sistemas biológicos. Asimismo, son el punto de partida para estudios taxonómicos, ecológicos, biotecnológicos y de biodiversidad. El mantenimiento y la conservación de los diferentes grupos de microorganismos permiten, por un lado, documentar el patrimonio de la diversidad biológica de un territorio y, por otro lado, identificar los cambios biológicos de una región, ya sea por influencia ambiental o antrópica, a través del tiempo.

Para garantizar la supervivencia, el mantenimiento y la conservación de una colección biológica compuesta por uno o varios grupos de microorganismos, se requiere del fortalecimiento de capacidades de orden científico, a partir de las cuales se consolidan las competencias técnicas de profesionales, investigadores y curadores de colecciones microbianas en métodos de conservación y caracterización para su uso y aprovechamiento.

### Antecedentes

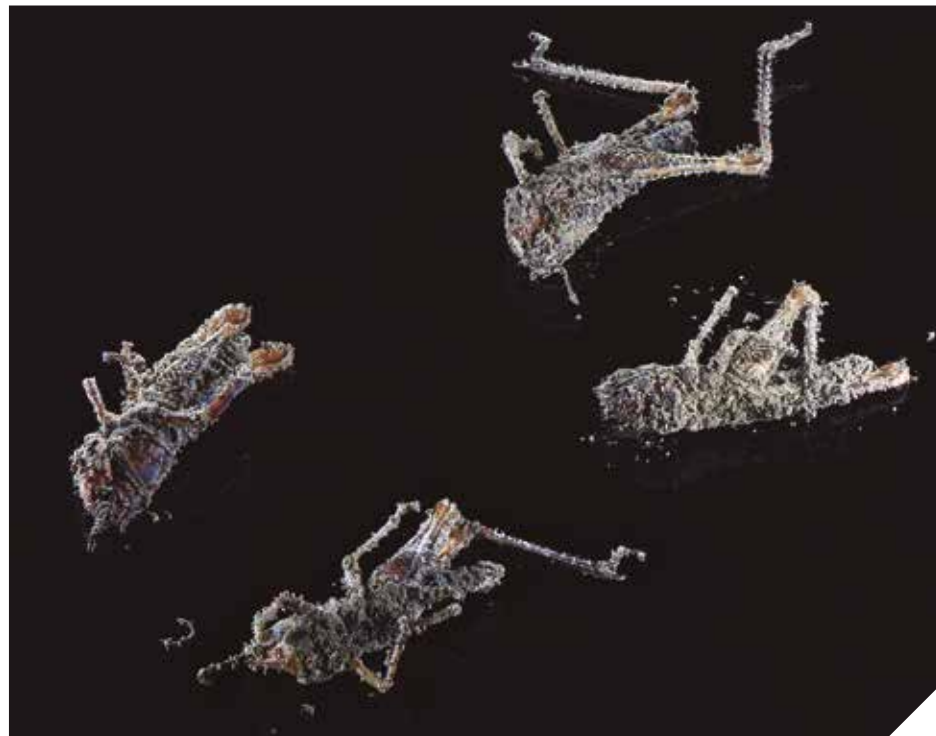
El primer Curso Internacional de Conservación y Manejo de Colecciones Microbianas, organizado por AGROSAVIA, la Universidad de los Andes y CorpoGén, se forjó como un espacio de confluencia para establecer una alianza con instituciones de investigación nacionales para el manejo de colecciones microbianas, con el propósito de fortalecer las capacidades en conservación, caracterización y uso, además de promover la interconectividad e interoperabilidad de dichas colecciones.

Metodológicamente, se orientó a explorar la estructura y el manejo de las colecciones microbianas en Colombia en comparación con el contexto alemán, lo que fue posible gracias a la participación de Jörg Overmann, director científico de la Colección de Microorganismos y Cultivos Celulares del Leibniz Institut DSMZ, de Alemania; el curso también se enfocó en estudiar la normatividad vigente para el registro de colecciones y en experiencias en conservación y manejo de colecciones microbianas. Con este panorama, se abrió el espacio a las estrategias de caracterización molecular y funcional de microorganismos, que son tendencias a nivel mundial en exploración, bioprospección y conservación. El componente teórico del curso se cerró con la presentación de experiencias en el análisis de casos en procesos de consecución de patentes. En el

componente práctico, se llevó a cabo la visita a las instalaciones de AGROSAVIA, donde los participantes del curso pudieron conocer las cuatro colecciones del Banco de Germoplasma de Microorganismos, además de interactuar con los profesionales y curadores encargados de su conservación.

La segunda edición del Curso Internacional de Manejo de Colecciones Microbianas, organizado por AGROSAVIA, la Universidad de los Andes y el Earlham Institute, del cual se desprende este documento, les permitió a los participantes apropiarse de herramientas y estrategias para garantizar la viabilidad, pureza y autenticidad de los diferentes tipos de microorganismos, para garantizar y mantener un uso sostenible de la agrobiodiversidad y contribuir de forma eficiente al crecimiento económico del país.

Para lograrlo, el curso contó con la participación de los formadores Jörg Overmann y Boyke Bunk, del Leibniz Institut DSMZ; Nicola Patron, líder del Synthetic Biology Group, del Earlham Institute, de Inglaterra, y de científicos colombianos como Nasmille Larke-Mejía, directora de laboratorio en Earth and Life System; Marta Vives, de la Universidad de los Andes, y Ángela María Alvarado, de la Pontificia Universidad Javeriana.



Temáticamente, las sesiones fueron orientadas principalmente al registro de colecciones microbianas en la World Federation for Culture Collections (WFCC), a los protocolos de registro y depósito de cepas microbianas en la colección DSMZ, a fundamentos de bioinformática aplicados al descubrimiento de microorganismos, al diseño de nuevos medios de cultivo para el aislamiento y conservación de microorganismos, al papel de las colecciones microbianas en la era de la microbiología sintética, a colecciones microbianas de interés médico y a colecciones microbianas innovadoras: aislamiento y conservación de bacteriófagos.

Metodológicamente, los temas se orientaron al ingreso y uso del sistema BacDive, al control de calidad a través de variables como la viabilidad y la pureza de las cepas microbianas conservadas, a generalidades, aislamiento, conteo y separación de esporas de micorrizas, a la caracterización morfológica de esporas, a la colonización de raíces y al registro del flujo de información mediante el *software* BioloMICS. También se trabajó la conservación, recuperación y caracterización taxonómica, fisiológica y biológica de los microorganismos con interés agrícola conservados con diferentes métodos, además de los medios de cultivo anaerobios del rumen y las técnicas de siembra con microorganismos de origen ruminal. Asimismo, se abordaron la evaluación taxonómica

y los métodos para la caracterización de microorganismos de interés en salud animal, como *Leptospira* y *Staphylococcus*; la reactivación y mantenimiento de la colección de ectoparásitos y hemoparásitos, y las estrategias de documentación para colecciones biológicas y la publicación de datos en el Sistema de Información Biológica (SiB). Finalmente, se trataron temáticas orientadas a la innovación, ética y uso responsable de la diversidad microbiana.

De este modo, con el propósito de proporcionar un



espacio de fortalecimiento de competencias y conocimientos científicos y técnicos en el manejo de colecciones microbianas, los invitados participaron en escenarios teóricos y prácticos que les permitieron identificar conceptos asociados al manejo de colecciones microbianas; estos conceptos fueron reforzados en el panel de expertos de la fase teórica. De la misma forma, se dieron a conocer los procedimientos para el registro y depósito de cepas microbianas en colecciones internacionales.

Adicionalmente, el espacio permitió describir las metodologías empleadas para la conservación, caracterización y documentación de las colecciones microbianas con potencial biotecnológico en el sector agropecuario, y a partir de este trabajo los participantes lograron identificar las metodologías presentadas en los escenarios de la práctica.

## Conclusiones

Con el paso del tiempo, las acciones de difusión y divulgación se han venido cualificando, lo que ha hecho evidente la creciente demanda de escenarios que permitan continuar generando y fortaleciendo capacidades técnico-científicas orientadas a la conservación de colecciones biológicas. En este sentido, los cursos internacionales llevados a cabo permitieron posicionar a AGROSAVIA como un interlocutor relevante en la materia, así como vislumbrar la falta de oferta de actividades de formación de alto nivel para curadores e investigadores en esta área, además de la necesidad de generar materiales de soporte para el fortalecimiento de capacidades y la promoción de alianzas entre actores dedicados a la conservación en el sector agropecuario. De allí que esta publicación constituya un aporte, junto con los clips tecnológicos de los capítulos de *Fronteras de la ciencia*, generados a partir del curso y disponibles en los espacios digitales de AGROSAVIA.

## Relacionamiento con instituciones universitarias nacionales

A partir de los dos cursos en Manejo de Colecciones Microbianas, se generó un relacionamiento institucional con organizaciones, instituciones y universidades del país —tanto de carácter público como privado— que igualmente mantienen colecciones de trabajo. A través de este relacionamiento ha sido posible generar alianzas en temas relacionados con conservación y caracterización de microorganismos, así como con conservación de especímenes en bancos de germoplasma en calidad de caja negra o copias de seguridad.

## Referencias

- Bonell Colmenero, R. (2007). El protocolo de Kioto y la tributación ambiental. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, (40), 71-100. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2267912>
- Comunidad Andina de Naciones (CAN). (2002, 7 de mayo). Decisión 523. Estrategia Regional de Biodiversidad para los Países del Trópico Andino. <https://www.mincit.gov.co/ministerio/normograma-sig/procesos-misionales/administracion-profundizacion-y-aprovechamiento-de/decisiones/decision-523.aspx>
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). (2019). Balance Social 2018. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/35024>
- Hammer, K., Arrowsmith, N., & Gladis, T. (2003). Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften*, 90, 241-250. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0433-4>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (1992). Convenio sobre la Diversidad Biológica. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Vásquez Romero, R. E., Tello Durán, J. E., & Martínez S., R. A. (2000). *El control de la varroasis: manejo genético como alternativa*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). [http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/3869/1/2006814101340\\_El%20control%20de%20la%20varroasis.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/3869/1/2006814101340_El%20control%20de%20la%20varroasis.pdf)



↑ *Bacillus amyloliquefaciens*, CMIB

## Capítulo II

39

# Conservación y autenticación de cepas microbianas

Lina Marcela Botero Rute  
Juan Camilo Ovalle Másmela  
Paola J. Criollo-Campos  
Urley A. Pérez-Moncada  
Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez  
Jennifer Lorena García Riaño  
Rocío Fenney Herrera León  
Ligja Denise Torres Higuera  
David Emigdio López Ardila

Sabrina del Carmen  
Jiménez Velásquez  
Óscar Gabriel Beltrán  
Germán A. Estrada-Bonilla  
Ruth R. Bonilla Buitrago  
Carol Viviana Amaya Gómez  
María Camila Rengifo Ibáñez  
Fernando Rodríguez Villamizar  
Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

Corporación Colombiana de  
Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).  
Centro de Investigación Tibaitatá.  
Mosquera, Cundinamarca, Colombia.  
Autora de correspondencia:  
Lina Marcela Botero Rute; correo  
electrónico: [lmbotero@agrosavia.co](mailto:lmbotero@agrosavia.co)

## Capítulo II. Conservación y autenticación de cepas microbianas

Colombia es el tercer país del planeta en megadiversidad y sus colecciones biológicas son un patrimonio de gran importancia, no solo para la nación, sino para el mundo. La conservación de estos microorganismos y especímenes biológicos es vital para el país, en primer lugar, para proteger la diversidad biológica de los territorios y, en segundo lugar, porque estos son la base para el estudio y desarrollo de estrategias sostenibles y sustentables para la producción agrícola, pecuaria e industrial de la nación.

Para el correcto mantenimiento y administración de las colecciones microbianas bajo la custodia de AGROSAVIA, se ha requerido del estudio, la estandarización y el uso de diferentes técnicas de conservación que han permitido garantizar la viabilidad y pureza de los microorganismos en el tiempo, además de preservar sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas. En este capítulo se presentan las generalidades de los métodos de conservación microbiana disponibles, incluyendo los crioprotectores más empleados para la conservación a corto, mediano y largo plazo.

Adicionalmente, busca que los curadores o administradores de las colecciones biológicas conozcan un panorama general sobre la conservación y autenticación de cepas microbianas, con el fin de que dicha información permita mantener las características más relevantes y el potencial de los



*Lactobacillus rhamnosus* en microscopía de contraste, accesión CMINA ↑

microorganismos conservados. También se mostrarán los procedimientos para realizar el control de calidad que ayuden a evidenciar la autenticidad microbiana mediante técnicas fenotípicas y moleculares. No obstante, en los siguientes capítulos se presentarán las particularidades de las colecciones que conforman el Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA, junto con las experiencias adquiridas en el transcurso de los años en cuanto a manejo, conservación y estudio de la identificación taxonómica y la caracterización de atributos de los microorganismos y especímenes biológicos con potencial biotecnológico.

## Generalidades sobre la conservación

De acuerdo con la World Federation for Culture Collections (wfcc, 2010), los microorganismos requieren, frecuentemente, de métodos especiales de conservación para asegurar su viabilidad y almacenamiento en el tiempo, además de su pureza. Por seguridad, y para reducir la probabilidad de perder las cepas conservadas, cada una debe mantenerse mínimo bajo dos métodos de conservación, de acuerdo con sus características.

La liofilización, el almacenamiento a temperatura ultrabaja ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o el almacenamiento en nitrógeno líquido (criopreservación a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) son los métodos de conservación más recomendados para minimizar el riesgo de que se presenten cambios genéticos en los microorganismos, dado que todos los procesos metabólicos se suspenden por la falta o baja disponibilidad de agua o por las bajas temperaturas (Heckly & Quay, 1981). Los rangos de congelación, las condiciones de liofilización y el tipo de crioprotector utilizado son muy importantes para garantizar la viabilidad de las cepas, pues pueden afectar la capacidad de supervivencia de las células durante el proceso de conservación y reducir los tiempos de almacenamiento. En consecuencia, se hace necesario validar procedimientos que aseguren la supervivencia óptima, especialmente para grupos particulares de microorganismos (Strasser et al., 2009). No obstante, ya que los métodos descritos anteriormente son muy costosos, se pueden utilizar estrategias de conservación más económicas pero menos eficientes en cuanto a la garantía de la estabilidad microbiológica en el tiempo (pues se reduce su visibilidad), además de que aumentan el riesgo de perder la estabilidad genética del microorganismo (Morales-García et al., 2010; Torres Higuera et al., 2008). Adicionalmente, es importante el desarrollo y validación de otros protocolos de conservación, como la refrigeración y la desecación, así como incluir, en los procedimientos de manejo de cepas, la estandarización de los procesos de deshielo o reconstitución, que

son fundamentales para recuperar el mayor número de células viables de los diversos grupos de microorganismos conservados (Rojas-Tapias et al., 2013).

Es pertinente contar con un duplicado de seguridad de las cepas más importantes o irremplazables y de la documentación asociada, que debe estar almacenada, de forma segura, en un edificio diferente o en una ubicación distante (WFCC, 2010).

Para la conservación de cepas microbianas y para su viabilidad, estabilidad y pureza, se requiere el diseño específico de un protocolo de conservación para cada microorganismo o al menos para un grupo de estos, para lo cual se deben estudiar detenidamente las características y los componentes del medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de crecimiento, así como las condiciones de incubación y el intervalo entre resiembras (Liu et al., 2016; Shu et al., 2015; Shu et al., 2017).

### Equipamiento de conservación

Para garantizar que las condiciones de conservación y mantenimiento de cepas de microorganismos sean las adecuadas, se debe contar con un equipamiento mínimo que no ponga en riesgo su manipulación y almacenamiento. Así, contar con un tanque de nitrógeno líquido sería lo ideal; este debe tener un sensor que indique el nivel del nitrógeno presente, ya que, si el nivel disminuye severamente, la temperatura en el interior del tanque podría afectar la viabilidad de las accesiones almacenadas en el tiempo. Cabe aclarar que los vapores de nitrógeno también permiten la conservación de las cepas, pero no garantizan el mismo tiempo de almacenamiento (Daily & Higgins, 1973).

En caso de no poder contar con un tanque de nitrógeno líquido, se puede pensar en conservar las cepas en un ultracongelador, que es la segunda opción más utilizada para el almacenamiento de microorganismos. Por otro lado, un congelador convencional permite almacenar accesiones de trabajo a un bajo costo, pero los tiempos de almacenamiento se reducen considerablemente. Finalmente, un refrigerador es otra alternativa, pero los tiempos de viabilidad también son muy cortos y no garantiza la viabilidad de las cepas, además de que se aumenta la tasa de variabilidad genética (Krumnow et al., 2009).

## Agentes crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias que protegen a las células frente al daño producido por la congelación debido a la formación de cristales de hielo, frente al cambio en la concentración de electrolitos, frente a los cambios en la conductividad y frente a otros aspectos metabólicos y fisiológicos relacionados con las células microbianas y su entorno (Hunter-Cevera & Belt, 1996); los crioprotectores tienden a ser no electrolíticos y altamente hidrofílicos. Por otro lado, los crioprotectores cuentan con la capacidad de formar puentes de hidrógeno que sirven para garantizar la estabilidad de las macromoléculas (Towey et al., 2012), y, adicionalmente, poseen otras características, como no ser tóxicos para la célula y adherirse a los electrolitos, que incrementan su concentración durante la congelación, o a las moléculas de agua, para retrasar la congelación, lo que limita la deshidratación intracelular y reduce la toxicidad por influencia de los electrolitos. Entre los crioprotectores más conocidos y utilizados se encuentran el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), diversos tipos de azúcares (glucosa, trehalosa y sacarosa) y algunos aminoácidos (asparagina, alanina, prolina y serina) (Hubálek, 2003).

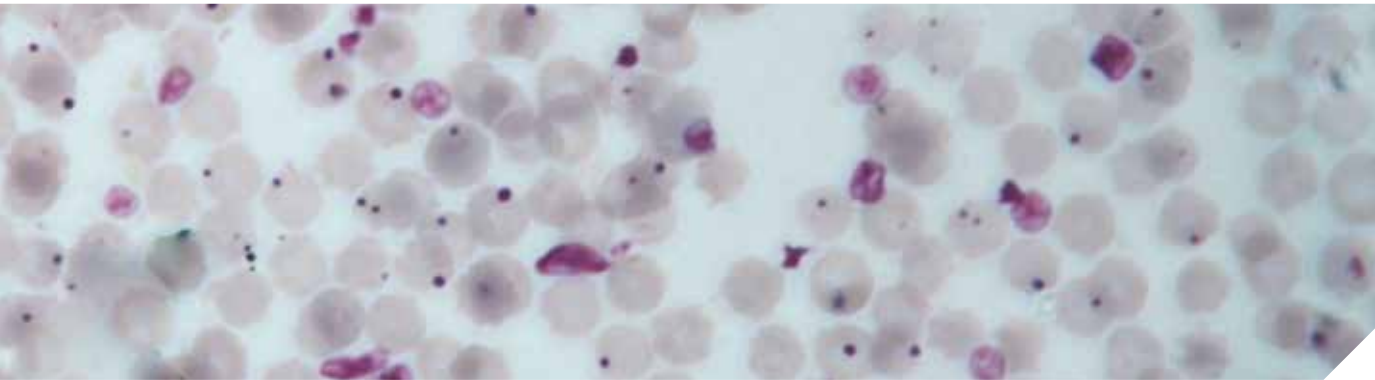
Los crioprotectores son clasificados de acuerdo con el tipo de acción sobre la célula. Existen los crioprotectores intracelulares, los cuales atraviesan la membrana celular y protegen intra y extracelularmente a la célula, y los extracelulares, que le permiten a la membrana de la célula mantener la resistencia contra ciertos fenómenos —como la ruptura— provocados por la hiperosmolaridad del medio circundante.

La selección del crioprotector es primordial para la viabilidad celular de los microorganismos y depende de su tipo y características. Las concentraciones de los crioprotectantes también varían, y están asociadas con las condiciones de almacenamiento, es decir, el método y la temperatura de conservación; sin embargo, las más utilizadas son: glicerol: 10 % (v/v); DMSO: 5 % (v/v), y sacarosa: 15-20 % (p/v) (Bhattacharya, 2018).

Los crioprotectantes, sin embargo, también pueden ser tóxicos para los microorganismos, razón por la cual se debe tener especial cuidado en la selección y en la compatibilidad



↑ *Azospirillum brasilense* en medio semisólido, CMIB



Eritrocitos infectados con *Anaplasma* sp. 100x. Tinción de Giemsa, CMISA ↑

del crioprotector con el tipo de cepa o grupo de microorganismos a conservar (Bhattacharya, 2018; Hubálek, 2003). En el caso del glicerol, este puede llegar a ser tóxico para hongos anaerobios de origen ruminal (Roger et al., 1992), pero, como es uno de los crioprotectores de mayor uso, la concentración de trabajo depende de la temperatura de almacenamiento de las cepas microbianas a conservar, por lo que se recomienda, para almacenar en nitrógeno líquido o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , usar una concentración final del 10 al 15 % de glicerol. No obstante, en un congelador convencional, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los daños previsibles son mayores, y por eso conviene aumentar la concentración a entre 30 y 35 %. Adicionalmente, se recomienda que, una vez las células microbianas entren en contacto con el glicerol, se espere al menos media hora a temperatura ambiente para que alcancen una buena concentración intracelular.

44

Algunos crioprotectores pueden penetrar rápidamente la membrana de las células, mientras que otros lo pueden hacer lentamente; el glicerol, por ejemplo, puede penetrar desde la pared celular hasta la membrana citoplasmática y es uno de los más utilizados en sistemas de conservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cody et al., 2008; Criste et al., 2014; Prakash et al., 2013). El DMSO, por su parte, tiene una mejor capacidad de penetración, pero su uso es limitado debido a efectos tóxicos en las células a concentraciones más altas (Hubálek, 2003).

La velocidad de congelación y descongelación también es un factor importante, independientemente del tipo de crioprotectante en el cual las cepas estén conservadas. Cuando la congelación se realiza de manera acelerada, se forman cristales de hielo en el interior de la célula, mientras que, si la congelación es lenta, el daño está relacionado con el aumento en la concentración de solutos dentro de la célula (Dumont et al., 2004; Prakash et al., 2013). Respecto de la velocidad de descongelación, es recomendable una descongelación rápida (a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en baño de María), ya que los cristales de hielo que se forman

cuando las células son congeladas rápidamente crecen aún más durante la descongelación lenta y se cree que pueden causar mayor daño físico a las células microbianas (Prakash et al., 2013).

## Métodos de conservación

A continuación se describen los métodos de conservación más utilizados en microorganismos: conservación por siembra en intervalos, en agua destilada estéril, por liofilización y por criopreservación.

### Conservación por siembra en intervalos

La conservación por este método es realizada principalmente para el mantenimiento de cepas de trabajo; este procedimiento, en el que los organismos permanecen activos durante todo el proceso, consiste en inocular un microorganismo activo en un medio de crecimiento favorable, a una temperatura de incubación apropiada, para luego almacenarlo en condiciones determinadas según de qué tipo se trate —normalmente, la cepa microbiana es almacenada en refrigeración—. Este proceso es repetido en intervalos de tiempo que garanticen la obtención de un cultivo fresco antes de la pérdida de viabilidad del cultivo almacenado (Philip et al., 2018). Aunque este método ha sido diseñado para ser seguro, confiable y útil para el almacenamiento de un amplio grupo de microorganismos, y si bien la variabilidad genética resultante es alta, la viabilidad y estabilidad de los cultivos microbianos es baja respecto de la conservación por congelación o por liofilización (Arencibia et al., 2008).

### Conservación en agua destilada estéril

La conservación microbiana con este método es una alternativa a la cual se recurre cuando no se cuenta con las condiciones para emplear la congelación o la liofilización, ya sea porque la cepa microbiana no resiste dichos métodos o bien porque se carece de los equipos necesarios. Este método es recomendable para cepas de uso continuo, y aunque la viabilidad es limitada, así como con el método por siembra en intervalos, con este las cepas pueden mantenerse almacenadas por periodos más largos de tiempo; no obstante, su uso no puede prolongarse por más de dos años (Lloyd, 1994).

Este método consiste en suspender las células microbianas que se desea conservar en agua destilada estéril o en soluciones isotónicas, como *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y solución salina estéril (0,85 % [p/v]). Con este procedimiento, las células no están del todo inactivas, pero

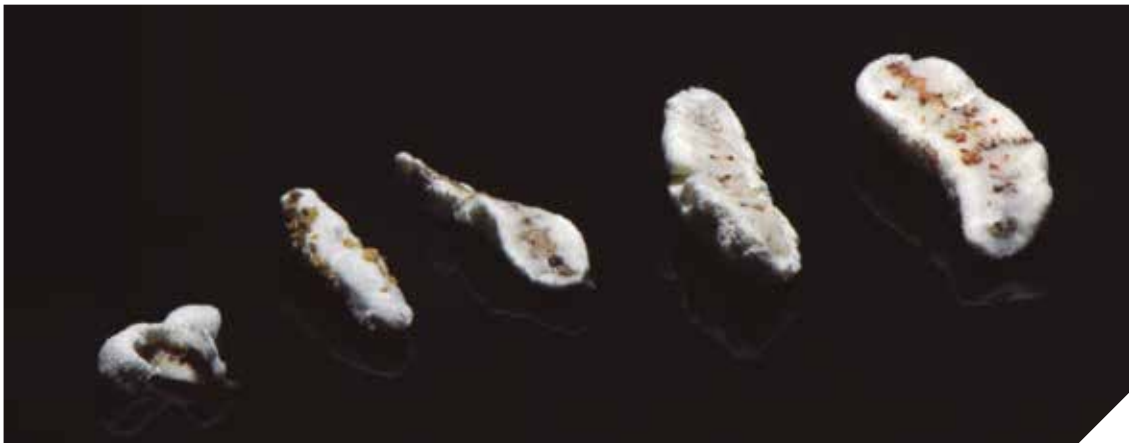
mantiene un nivel metabólico bajo (Liao & Shollenberger, 2003). Según Burdsall y Dorworth (1994), la conservación en agua no afecta significativamente la tasa de crecimiento, la viabilidad o la estabilidad genética.

## Conservación por liofilización

La liofilización es un método de conservación comúnmente utilizado en la preservación de bacterias, levaduras y hongos esporulados. Sin embargo, mientras el proceso es llevado a cabo, las células microbianas pueden sufrir daños en la membrana celular provocados por la formación de cristales de hielo, la alta osmolaridad, el aumento de solutos en la célula y la desnaturalización del ADN, lo que podría influir directamente sobre la viabilidad de la cepa microbiana y la posterior reactivación y recuperación de los microorganismos (figura 3) (Ávila Rincón et al., 2015; Han et al., 2018; Stefanello et al., 2018; Stephan et al., 2016).

Para garantizar la máxima supervivencia celular y un mayor tiempo de almacenamiento de las cepas microbianas, parámetros físicos, químicos y biológicos deben ser tenidos en cuenta, además del tipo de lioprotector y el medio de rehidratación y reactivación posliofilización (Han et al., 2018; Polo et al., 2017).

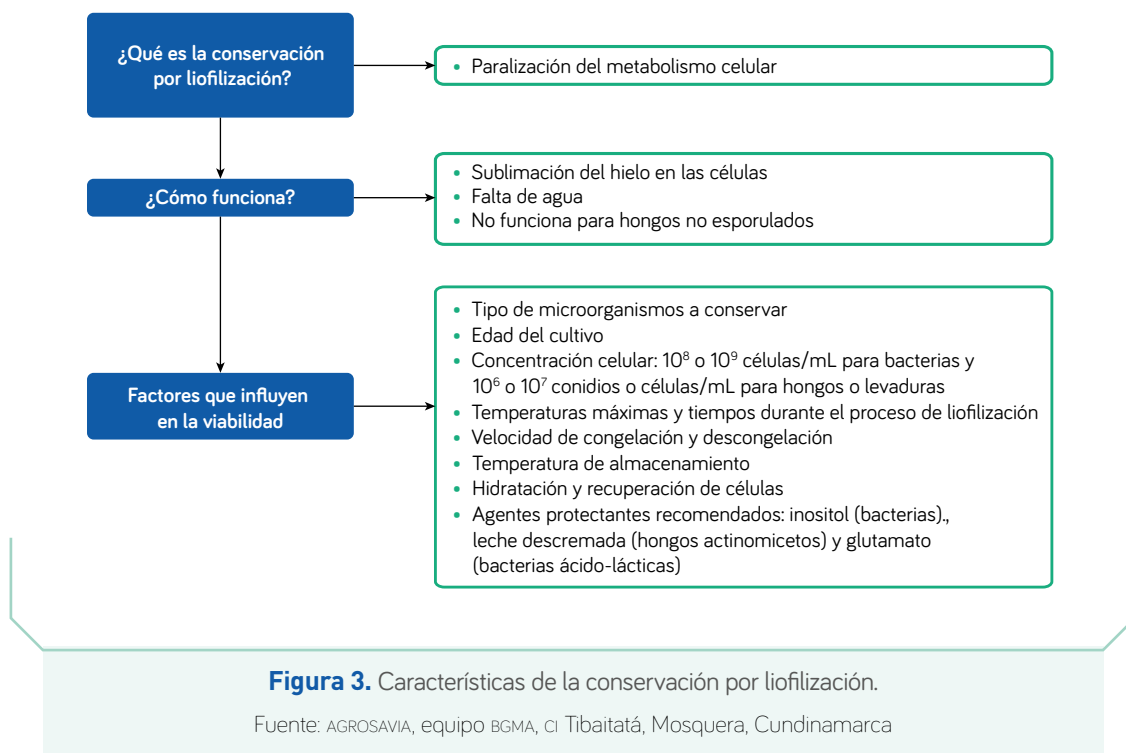
Para este método, así como para los otros, se recomienda que el cultivo microbiano se encuentre en el punto final de la fase exponencial o en el inicio de la fase estacionaria, como es el caso de las bacterias. Dado que en este momento las células bacterianas se encuentran en mayor número, son estables y capaces de soportar condiciones extremas durante el proceso de liofilización; además, en este periodo se pueden expresar compuestos que



Larvas de *Diatraea saccharalis* colonizadas por *Beauveria bassiana*. CMICB ↑

permitan proteger a las células contra las condiciones extremas de temperatura y desecación (Barragán Cárdenas & Lesmes Hernández, 2009).

Para el caso específico de la liofilización, el uso de lioprotectores ayuda a disminuir los cambios en el estado físico de la membrana lipídica o las modificaciones en la estructura proteica (Tang et al., 2007). Entre los diversos tipos de lioprotectores que pueden ser usados, se encuentran los aminoácidos, los disacáridos, los polisacáridos, los polioles y las proteínas. No obstante, diversos estudios han establecido que, en la formulación del lioprotector, un uso combinado entre disacáridos, leche descremada y otros compuestos proteicos protege mejor a las células durante el proceso de liofilización (Han et al., 2018; Kupletskaya & Netrusov, 2011; Polo et al., 2017; Stefanello et al., 2018; Zhang et al., 2016; Zhao & Zhang, 2005). Los lioprotectores más comúnmente utilizados en liofilización son el ácido glutámico al 0,067 mol/mL y leche descremada + medio de cultivo (1:1) para bacterias ácido-lácticas, glucosa al 15 % + leche descremada (1:2) para levaduras, inositol al 5 % para otro tipo de bacterias y leche descremada al 10 % para hongos filamentosos esporulados, bacterias del género *Streptomyces* y otras bacterias (Peiren et al., 2015; Sharma et al., 2018).



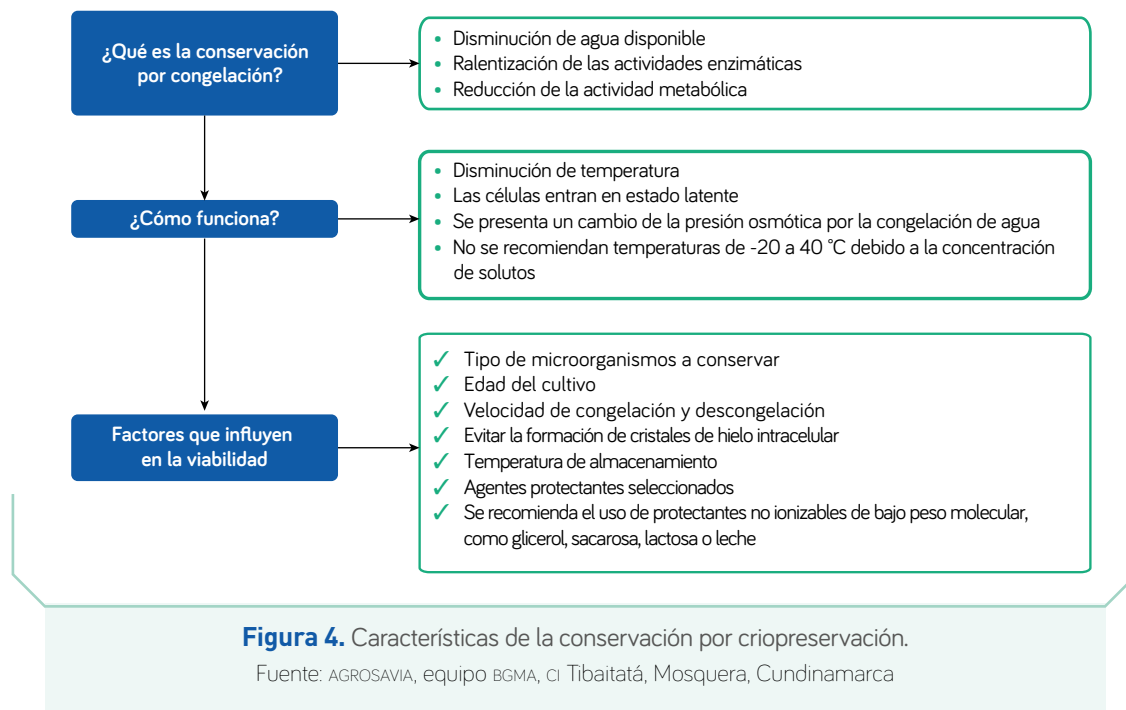
## Criopreservación

Este método hace referencia a la preservación de microorganismos a temperaturas criogénicas —entre  $-80$  y  $-196$  °C—. Bajo estas condiciones de frío, se protegen las proteínas y el ADN de la desnaturalización, y además se ralentiza el movimiento del agua celular, por lo que bioquímica y fisiológicamente la actividad celular se detiene y las células microbianas pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo. La conservación a  $-80$  °C es adecuada, pero se considera que la criopreservación a  $-196$  °C es ideal debido a que las posibilidades de mutación del ADN a esta temperatura son casi nulas (Kerckhof et al., 2014).

Durante la criopreservación, los tubos criogénicos pueden ser almacenados directamente en nitrógeno líquido a  $-196$  °C, pero también es posible mantenerlos en su fase gaseosa, que permite unas temperaturas entre  $-135$  y  $-150$  °C. De acuerdo con el tubo criogénico, la fase de vapor es más recomendable, debido a que se evita exponer a los conservados a una posible filtración de nitrógeno al interior de los tubos criogénicos y a una probable contaminación (Smith et al., 2008).

Este método mantiene la viabilidad y estabilidad de las accesiones conservadas por más de quince años, lo que permite disminuir el costo de las labores de mantenimiento. En este método se utilizan crioprotectores como leche descremada, glicerol, sacarosa, glucosa, lactosa, dextrano, propilenglicol y DMSO; el uso de uno en particular, al igual que en la liofilización, depende exclusivamente de las características del microorganismo que se va a conservar (Colección Española de Cultivos Tipo [CECT], 2016; Kitamoto et al., 2002; Wolkers & Oldenhof, 2015).

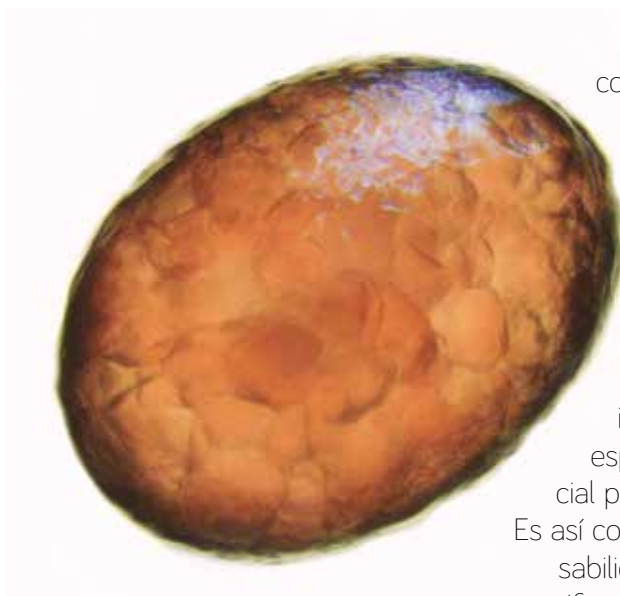
Aunque los métodos de criopreservación están bien establecidos y han dado buenos resultados en términos de viabilidad e integridad genotípica con la mayoría de los microorganismos, es necesario optimizar protocolos, partiendo de la selección adecuada de los crioprotectores, además de tener en cuenta otras condiciones específicas para cada grupo de microorganismos (figura 4) (Prakash et al., 2013; Torres Higuera et al., 2008).



## Autenticación de cepas

La conservación y mantenimiento de microorganismos es una labor que debe tener en cuenta aspectos como la viabilidad y pureza de los conservados; no obstante, cuando una nueva cepa va a ser depositada en cualquier colección biológica, o luego de realizar una primera conservación o lote, es importante determinar la correcta identidad de la cepa. Por otro lado, investigadores en diferentes partes del mundo hacen uso de las colecciones para el desarrollo de sus proyectos de investigación, razón por la cual una colección biológica debe garantizar la correcta identificación de las cepas solicitadas. De no ser así, los diferentes proyectos de investigación corren el riesgo de usar cepas que no corresponden a la solicitud realizada, lo que pone en peligro el correcto curso de la investigación y, de esta forma, genera un déficit de presupuesto, retraso en los tiempos de entrega de resultados y la publicación de resultados erróneos, además de que se pone en riesgo al personal que manipula el material biológico entregado.

La autenticidad de las cepas tiene en cuenta la verificación de sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas para determinar que el material conservado corresponda al material original que se ingresó y documentó en la



↑ Huevo de garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus*, CMISA

colección. Por tal razón, se recomienda que, para evitar cualquier tipo de variabilidad en la bioquímica y genética de la cepa autenticada, se realice el menor número posible de pases en el tiempo (CECT, 2016).

A partir de lo anterior, es necesario determinar correctamente la identidad genética de las cepas, ya que esta permite obtener otra información relevante acerca del género o la especie, incluyendo el grupo de riesgo y la potencial producción de toxinas, entre otras características. Es así como las colecciones biológicas tienen la responsabilidad de suministrar los recursos con una identificación precisa y veraz, asegurándose de que los organismos que suministran sean auténticos. En este orden de ideas, la taxonomía y la sistemática acopladas a herramientas moleculares son indispensables para la identificación exacta de microorganismos (Emerson et al., 2008).

Para asegurar que los métodos de conservación de los microorganismos permitan mantener sus características físicas, bioquímicas y genéticas, se deben realizar actividades de autenticación que incluyen viabilidad y pureza de las células, evaluaciones morfológicas, habilidades de crecimiento en diferentes medios de cultivo, actividad biológica, integridad molecular y patogenicidad, evaluaciones que podrían realizarse con métodos fenotípicos y moleculares, lo cual depende exclusivamente del tipo de microorganismo o espécimen conservado (Smith & Ryan, 2012).

### Caracterización morfológica

Las características morfológicas macro y microscópicas son fundamentales a la hora de determinar la identidad de un microorganismo. Estos factores pueden dar vía libre a evaluaciones más específicas, que le facilitan al investigador o curador de la colección una ruta de caracterización precisa. En este punto, se evalúan características morfológicas macroscópicas, que incluyen homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias, además de la producción de pigmentos, el tipo de hemólisis, entre otras. En cuanto a los rasgos microscópicos, se observa forma y tamaño celular, movilidad, y, de acuerdo con el tipo de microorganismo, se pueden utilizar tinciones que permiten identificar estructuras o estadios particulares de la cepa (Gülaydin et al., 2019; Hervé, 2015).

## Caracterización fisiológica, bioquímica e inmunológica

A partir de la caracterización morfológica, se traza una ruta para determinar qué otras características hacen parte de la biología de la cepa que se está estudiando. Se trata de pruebas que evidencian el tiempo de crecimiento y la actividad enzimática frente a diferentes sustratos que el microorganismo transforma o no al crecer. La asimilación o capacidad de utilización de diversos compuestos como fuente única de carbono o nitrógeno, la fermentación de diferentes azúcares (degradación anaeróbica) y el crecimiento y aspecto en medios de cultivo selectivos y diferenciales son elementos clave en el proceso de autenticidad microbiana (Chatellard et al., 2016).

En los siguientes apartados se describen algunas de las pruebas de caracterización comúnmente utilizadas e indispensables en el momento de establecer un perfil para los microorganismos.

### Tinciones diferenciales

Entre las caracterizaciones fisiológicas, se encuentran las tinciones diferenciales, las cuales permiten establecer desde un principio el tipo de microorganismo a conservar según las características de pared celular; dichas diferencias pueden ser vistas con la tinción de Gram, en el caso de las bacterias, y la tinción azul de lactofenol, para el caso de los hongos.

#### Tinción de Gram

Esta técnica, que es la más utilizada, permite diferenciar dos grupos de bacterias según sus características de pared: la tinción las separa en Gram-positivas o Gram-negativas de acuerdo con el color resultante. Las bacterias presentan, dentro de la pared celular, una capa de peptidoglicano que distingue las bacterias según su capacidad de retener los colorantes una vez aplicados. Así, las bacterias Gram-positivas, al poseer una capa gruesa de peptidoglicano, que permite retener el colorante cristal violeta, se tiñen de este color, y las bacterias Gram-negativas, por su parte, al poseer una capa delgada de peptidoglicano, en la cual no se fija el cristal violeta pero sí la safranina (colorante rojo), se tiñen de color rosado/rojo (Gerhardt et al., 1981; Smith & Marise, 2019).

### Tinción azul de lactofenol

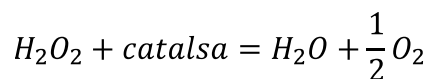
Los hongos, por su parte, también pueden ser diferenciados por medio de la tinción, la cual puede distinguir dos grandes grupos de hongos: los que se tiñen de azul, llamados “hialinos”, y los que no se tiñen, llamados “dematiáceos” por presentar coloraciones cafés según la producción de pigmentos. El protocolo utiliza la preparación de azul de lactofenol, que induce la muerte de la célula por acción del fenol; el azul de lactofenol permite preservar las estructuras del hongo muestreadas y coloreadas por el azul de anilina presente (Wanger et al., 2017, capítulo 5).

### Catalasa y oxidasa

Para el control y la diferenciación rápida de los microorganismos, se encuentran los test bioquímicos de catalasa y oxidasa; estos son ampliamente utilizados y han sido descritos desde 1976 como herramientas taxonómicas (Jurtshuk & McQuitty, 1976) para la diferenciación de microorganismos Gram-positivos (mediante el test de catalasa) y para la diferenciación de géneros como *Aeromonas* sp., *Plesiomonas* sp. y otros microorganismos de la familia Enterobacteriaceae (con el test de oxidasa) (Taylor & Achanzar, 1972).

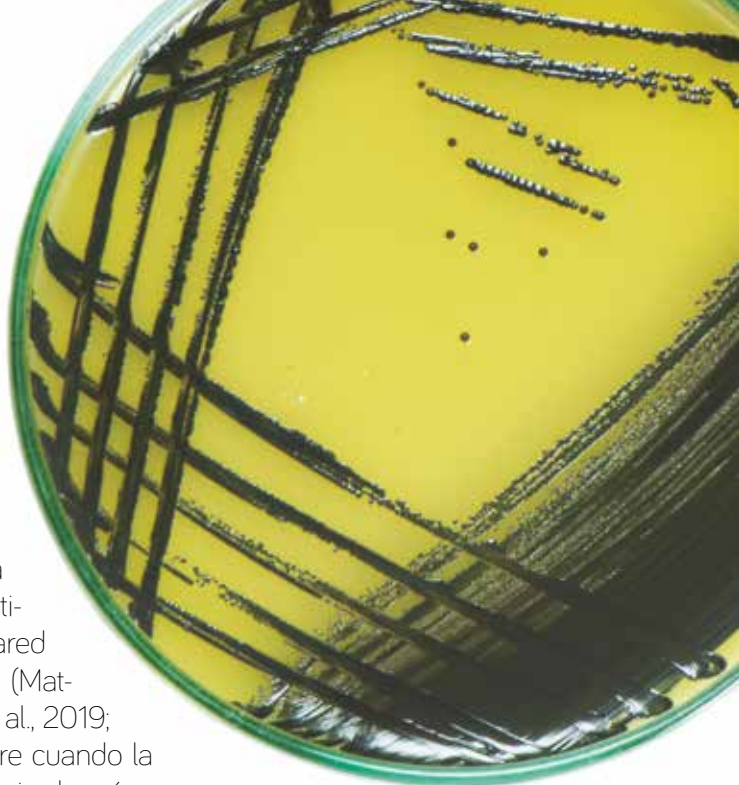
Entre las múltiples actividades metabólicas de los microorganismos, la producción de enzimas facilita la transformación de numerosos compuestos para la obtención de energía; además, entre los compuestos producidos por bacterias, se encuentra el peróxido de hidrógeno (Sanchez & Demain, 2017), pero la producción en altas cantidades puede resultar tóxica para las células, por lo cual estos microorganismos han desarrollado enzimas que pueden proteger a la célula, más precisamente, la enzima catalasa (Erttmann & Gekara, 2019).

La detección de esta enzima permite distinguir entre microorganismos del género *Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp.; la reacción de detección está basada en la siguiente ecuación (Aslanzadeh, 2006):



La ecuación representa la reducción del peróxido mediante la enzima catalasa, liberando agua y oxígeno; esta reacción, visualmente, está dada por la formación de burbujas, que indica que el microorganismo evaluado posee la enzima, mientras que la reacción negativa no genera burbujas (Aslanzadeh, 2006; Reiner, 2010).

Por otro lado, el test de oxidasa detecta la enzima oxidasa o indofenol oxidasa, la cual hace parte de la cadena de transporte de electrones y se relaciona con la actividad respiratoria aerobia de los microorganismos; esta prueba resulta ser positiva para la gran mayoría de los microorganismos Gram-negativos, debido a la composición de la pared y al sistema de citocromo utilizado (Matsuno & Yumoto, 2015; Pankratova et al., 2019; Sone et al., 2004). La reacción ocurre cuando la enzima indofenol oxidasa, en presencia de oxígeno, reduce el compuesto TMPD (*tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*) y forma el compuesto púrpura indofenólico, coloración que indica una respuesta positiva; una reacción negativa es asumida cuando no existe un cambio de color (Aslanzadeh, 2006; Shields & Cathcart, 2010).



*Staphylococcus aureus* en agar Baird-Parker, CMISA

## Crecimiento microbiano y fermentación de sustratos

El crecimiento microbiano forma parte integral del componente de caracterización de las cepas que hacen parte de las colecciones de microorganismos de AGROSAVIA. Es evidente la importancia de identificar los tiempos en que cada cepa puede desarrollarse en diferentes tipos de sustrato, además porque esto permite conocer sus habilidades frente a otro tipo de condiciones de temperatura, pH y agitación, entre otras. Para el caso de las bacterias, su crecimiento es exponencial y habitualmente se ajusta a una curva sigmoidea, con excepción de aquellos microorganismos que cuentan con crecimiento diaúxico (Calderón Vargas, 2017). Por otro lado, los hongos filamentosos crecen por extensión de sus hifas, a diferencia de la mayoría de las levaduras, cuyo crecimiento y producción de biomasa se asocia con mecanismos de gemación (Arias Cifuentes & Piñeros Espinosa, 2008).

El crecimiento es evaluado mediante un proceso cinético en el que los microorganismos, a medida que se multiplican y consumen el sustrato del medio donde se encuentran, agotan los nutrientes al mismo tiempo que otros metabolitos son acumulados. La relación que se da entre el sustrato, los metabolitos y la biomasa producida es denominada “cinética de fermentación”; este proceso permite evaluar diferentes tipos de parámetros (temperatura,

pH, agitación, entre otros) y variables (velocidad específica de crecimiento, biomasa, reactivo limitante, entre otras) (Rodríguez & Carvajal, 2011).

### Caracterización por sistemas comerciales miniaturizados

Son métodos que evidencian de forma rápida una determinada actividad enzimática, de un grupo de enzimas o de una vía metabólica, por medio de diferentes sustratos que el microorganismo puede o no utilizar durante su crecimiento. Existe una gran variedad de métodos miniaturizados automatizados y semiautomatizados que se utilizan para realizar este tipo de evaluaciones.

Estos métodos son considerados fáciles y rápidos, presentan resultados, en algunos casos, entre 8 y 24 horas después de realizados, y algunos cuentan con *software* para los análisis estadísticos de los datos (Gülaydin et al., 2019; Hervé, 2015); sin embargo, la limitación más generalizada de este tipo de métodos viene determinada por la base de datos frente a la cual se comparan los resultados, ya que estas suelen abarcar principalmente microorganismos de interés clínico o alimentario.

Adicionalmente, en la mayoría de los casos, los sistemas miniaturizados no tienen en cuenta requerimientos salinos, de pH y de factores de crecimiento, entre otros. En el caso de ser utilizados con cepas que no están incluidas en dicha base de datos, es importante estandarizar la metodología para conseguir una reproducibilidad óptima en futuros análisis.



*Bacillus megaterium* en microscopía de contraste, accesión CMB ↑

A continuación se describen los métodos comerciales más utilizados:

- API: es reconocido como uno de los sistemas comerciales más utilizados en la autenticación de cepas, ya que permite la identificación de microorganismos mediante la realización de diferentes pruebas bioquímicas, como la fermentación de carbohidratos, la determinación de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y la hidrólisis de la gelatina, entre otras. Para hacer uso de este sistema, es fundamental haber caracterizado morfológicamente la cepa para conocer sus características básicas, como su morfología celular, si es Gram-positiva o Gram-negativa y la reacción de la prueba de oxidasa o de la prueba del O/F (oxidación-fermentación). Así pues, existen distintas galerías según el microorganismo a estudiar, como el test API 20A, para caracterizar microorganismos anaerobios, como bacterias del género *Clostridium*; el test API 20E, que permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram-negativos; el test API 20NE, que permite la identificación de bacilos Gram-negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias, como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Moraxella* sp., *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp., entre otros, y la prueba API 50 CHL, que permite el estudio metabólico de carbohidratos y facilita la identificación de bacterias ácido-lácticas principalmente del género *Lactobacillus* sp., entre otros.
- Sistemas RapID: entre los sistemas miniaturizados de rápida identificación, también se encuentra el sistema BBL Crystal ID, que utiliza 29 pruebas bioquímicas especializadas en bacterias Gram-positivas y que, al igual que el API, permite obtener un perfil bioquímico y una identificación de microorganismos provenientes de muestras clínicas; la lectura debe ser manual e interpretada mediante el *software* BBL Crystal MIND. Otros de los sistemas son el Sensititre, de Thermo Fisher Scientific, y el Vitek 2, de BioMérieux, que permiten además determinar la susceptibilidad frente a antibióticos y cuentan con una lectura automatizada; además, Vitek 2 también realiza la inoculación y la incubación de forma automática.
- Biolog: es otro sistema ampliamente utilizado en taxonomía y que puede ser útil para la autenticación de cepas. Biolog analiza la capacidad de los microorganismos para oxidar un total de hasta 95 sustratos, de modo que, cuando un sustrato es oxidado, se detecta mediante una reacción colorimétrica producida por una sal de tetrazolio que actúa como aceptor de electrones y vira hacia una coloración púrpura. Los datos son recogidos por un sistema informático (Bochner, 2009).

Los sistemas miniaturizados basados en pruebas bioquímicas tienen a su favor aspectos como la estandarización y la facilidad en las condiciones de manejo y manipulación. Aunque sus bases de datos son limitadas y representan un costo adicional, la mayoría de las cepas de uso habitual en control de calidad suelen tener perfiles conocidos y cabe la posibilidad de emplearlos con otras cepas, si es necesario, haciendo modificaciones en el protocolo. Esta práctica es bastante habitual en taxonomía procariota y por ello existen muchos datos generados en diversos artículos de descripción de especies. Aparte de la falta de universalidad, estos sistemas tienen otras limitaciones, como un poder discriminatorio bajo y problemas de interpretación y reproducibilidad en muchos casos. Asimismo, existen sistemas informáticos que permiten la interpretación de los resultados de distintos sistemas miniaturizados con el fin de eliminar el sesgo producido por la subjetividad del personal técnico.

### Inmunoensayos

A pesar de que las técnicas o metodologías inmunológicas se emplean para la detección rápida de patógenos en estudios clínicos, en la industria de alimentos y en el sector ambiental, también pueden ser utilizadas en la verificación y caracterización de microorganismos de colecciones biológicas.

Los inmunoensayos se basan en la detección de la interacción antígeno-anticuerpo, la cual puede ser cuantificada. Para esta interacción, se requiere que el anticuerpo sea específico al analito involucrado, y así el anticuerpo está diseñado para captar de manera selectiva el analito. Por otro lado, los inmunoensayos pueden basarse en una reacción colorimétrica, fluorescente y electroquímica, así como en reacciones de precipitación y aglutinación o en otros métodos como la citometría de flujo (Fundora Hernández et al., 2013; Marian & Seghezzi, 2013). Un ejemplo de ello es la detección colorimétrica por inmunoensayo de *Escherichia coli* en muestras de agua, con alta sensibilidad en detección y de operatividad simple (Eltzov & Marks, 2017).

### Métodos de identificación por herramientas moleculares

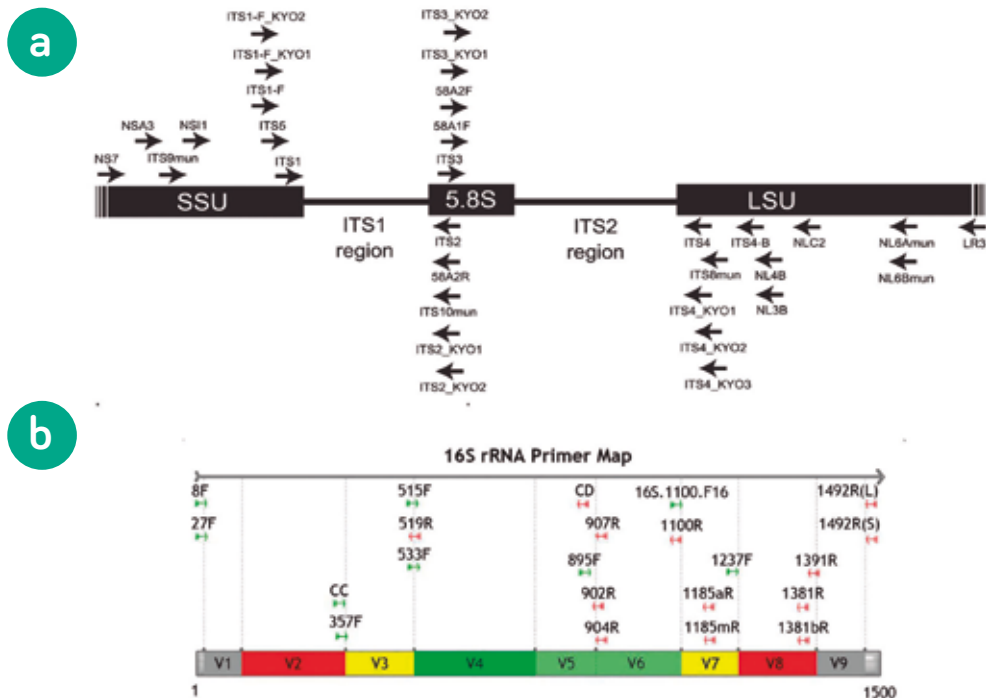
Existen muchas técnicas disponibles a nivel molecular para realizar la validación o control de calidad del material conservado. Algunas de estas utilizan la amplificación de blancos genéticos utilizando metodologías basadas en PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tales como PCR convencional, PCR múltiple, RT-PCR (*real time*-PCR), PCR anidada y PCR-RFLP (PCR por restricción de fragmentos de longitud polimórfica) (Adzitey et al., 2013). Otras técnicas determinan variaciones en el nivel de genoma completo, como AFLP (*amplified*

*fragment length polymorphism*), la rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic-PCR*) y los RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Kassama et al., 2002; Moser et al., 2010; Yamazaki et al., 1997). Otras metodologías que se utilizan para la autenticación de cepas se basan en el análisis de patrones proteicos de cepas bacterianas, como la técnica de Maldi-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight*) por espectrofotometría de masas, con la cual se pueden identificar el género y la especie (Singhal et al., 2015).

La elección entre esta amplia gama de metodologías dependerá de los objetivos de estudio; sin embargo, las metodologías de amplificación o secuenciación de genes o de secuenciación total de genomas han sido las metodologías de detección e identificación de microorganismos más utilizadas, debido a que son más objetivas y reproducibles (Reller et al., 2007).

## Amplicones

En la actualidad, prácticamente todas las colecciones de cultivos incluyen en la autenticación de sus cepas la secuenciación parcial o total de los genes 16S



**Figura 5.** Posición de los *primers* y zonas de amplificación para los genes ITS y 16S rARN. **a.** Mapa del gen ITS rARN; **b.** Mapa del gen 16S rARN.

Fuentes: **a.** Toju et al. (2012); **b.** Yang et al. (2016)

rARN (bacterias) e ITS rARN (hongos y levaduras); las regiones de ambos genes pueden ser secuenciadas por sectores, según se requiera (figura 5).

Las ventajas principales de esta técnica frente a otras son que los datos pueden estar disponibles en bases de datos públicas (GenBank, EMBL o DDBJ) y a disposición de la comunidad científica, que los resultados obtenidos son reproducibles intra e interlaboratorios y que el análisis de datos es escalable, lo que permite comparar secuencias de estudios independientes. El análisis posterior de la secuencia se realiza aprovechando las ventajas de algunas herramientas y recursos disponibles en la red (Balvočiute & Huson, 2017). El gen 16S rARN se ha utilizado ampliamente para el análisis evolutivo basado en secuencias, dado que está distribuido universalmente, su función es estable, presenta una tasa de evolución lenta y tiene una longitud adecuada. Sin embargo, el hecho de que presente una tasa de evolución lenta implica que en muchas ocasiones resulta difícil establecer relaciones filogenéticas entre taxones cuya divergencia es reciente. Por esta razón, se utiliza como marcador en rangos taxonómicos por encima de la especie (Delgado-Baquerizo et al., 2016).

### Genoma completo

Otra de las herramientas moleculares utilizadas para la identificación de microorganismos es la secuenciación de genoma completo por tecnologías de NGS (*new generation sequencing*), cuyo uso y adquisición se hace actualmente más común y fácil. La secuenciación de genomas completos resulta útil para la distinción de grupos de cepas que han sido identificadas mediante el gen 16S rARN y cuya identidad resulta ser la misma, con porcentajes superiores al 97 % en un Blast de identificación, pero cuyas características fisiológicas o bioquímicas son diferentes entre sí (Acinas et al., 2004; Johnson et al., 2019). Un ejemplo de ello se reporta con el género *Streptococcus*, el cual debe ser clasificado de acuerdo con diferentes métodos microbiológicos, incluyendo herramientas moleculares como la amplificación del gen 16S rARN y el uso de MLST (*multi-locus sequence typing*) para el establecimiento de poblaciones patógenas de una cepa; sin embargo, estas opciones pueden no brindar la información suficiente para su diferenciación, en contraste con la secuenciación completa, que permite determinar la variabilidad, la estructura y el dinamismo de pérdida y adquisición de genes de un microorganismo (Barajas et al., 2019).

## Referencias

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2629-2635. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004>
- Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, 3(2), 97-107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- Arencibia, D. F., Gámez, R., & Rosario, L. A. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. En *I Taller Científico de los Laboratorios Liorad, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y Otros Materiales Biológicos* (pp. 1-14). Liorad.
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinosa, P. A. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde* [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Aslanzadeh, J. (2006). Biochemical profile-based microbial identification systems. En Y.-W. Tang, & C. W. Stratton (eds.), *Advanced techniques in diagnostic microbiology* (pp. 84-116). Springer. [https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0\\_6](https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0_6)
- Ávila Rincón, L. C., Naranjo Vasco, J. M., & Higuera Vásquez, J. C. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Vector*, 10, 7-13. <https://docplayer.es/49042645-Viabilidad-de-levaduras-y-bacterias-conservadas-por-liofilizacion-efecto-de-agentes-lioprotectores.html>
- Balvočiute, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — How do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, 18(2), artículo 114. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Barajas, H. R., Romero, M. F., Martínez-Sánchez, S., & Alcaraz, L. D. (2019). Global genomic similarity and core genome sequence diversity of the *Streptococcus* genus as a toolkit to identify closely related bacterial species in complex environments. *PeerJ*, artículo 6233. <https://doi.org/10.7717/peerj.6233>
- Barragán Cárdenas, D. L., & Lesmes Hernández, A. del P. (2009). "Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas": elección del mejor método [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. En Y. Bozkurt (ed.), *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences* (pp. 7-19). IntechOpen.
- Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 191-205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x>

- Burdsall, H. H., & Dorworth, E. B. (1994). Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86(2), 275-280. <https://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1994/burds94a.pdf>
- Calderón Vargas, J. F. (2017). *Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de Lactobacillus acidophilus en la fermentación de un sustrato complejo* [tesis de pregrado, Fundación Universidad de América]. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6598/1/6121940-2017-2-IQ.pdf>
- Chatellard, L., Trably, E., & Carrère, H. (2016). The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresource Technology*, 221, 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.084>
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed – 80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (2016). *Memorias: III Certificado de Especialización en Conservación y Control de Cepas Microbianas* [manuscrito inédito].
- Criste, A. D., Giuburuncă, M., Negrea, O., Dan, S., & Zăhan, M. (2014). Research concerning use of long-term preservation techniques for microorganisms. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 47(2). <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/1795>
- Daily, W. A., & Higgins, C. E. (1973). Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen. *Cryobiology*, 10(5), 364-367. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(73\)90059-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(73)90059-X)
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7, artículo 10541. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>
- Dumont, F., Marechal, P.-A., & Gervais, P. (2004). Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 268-272. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.268-272.2004>
- Eltzov, E., & Marks, R. S. (2017). Colorimetric stack pad immunoassay for bacterial identification. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.044>
- Emerson, D., Agulto, L., Liu, H., & Liu, L. (2008). Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. *BioScience*, 58(10), 925-936. <https://doi.org/10.1641/b581006>
- Erttmann, S. F., & Gekara, N. O. (2019). Hydrogen peroxide release by bacteria suppresses inflammasome-dependent innate immunity. *Nature Communications*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11169-x>
- Fundora Hernández, H., Puig Peña, Y., Chiroles Rubalcaba, S., Rodríguez Bertheau, A. M., Gallardo Díaz, J., & Milián Samper, Y. (2013). Immunological methods for the quick identification of bacteria and protozoa in water. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1), 84-96. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubhigepi/chi-2013/chi131i.pdf>

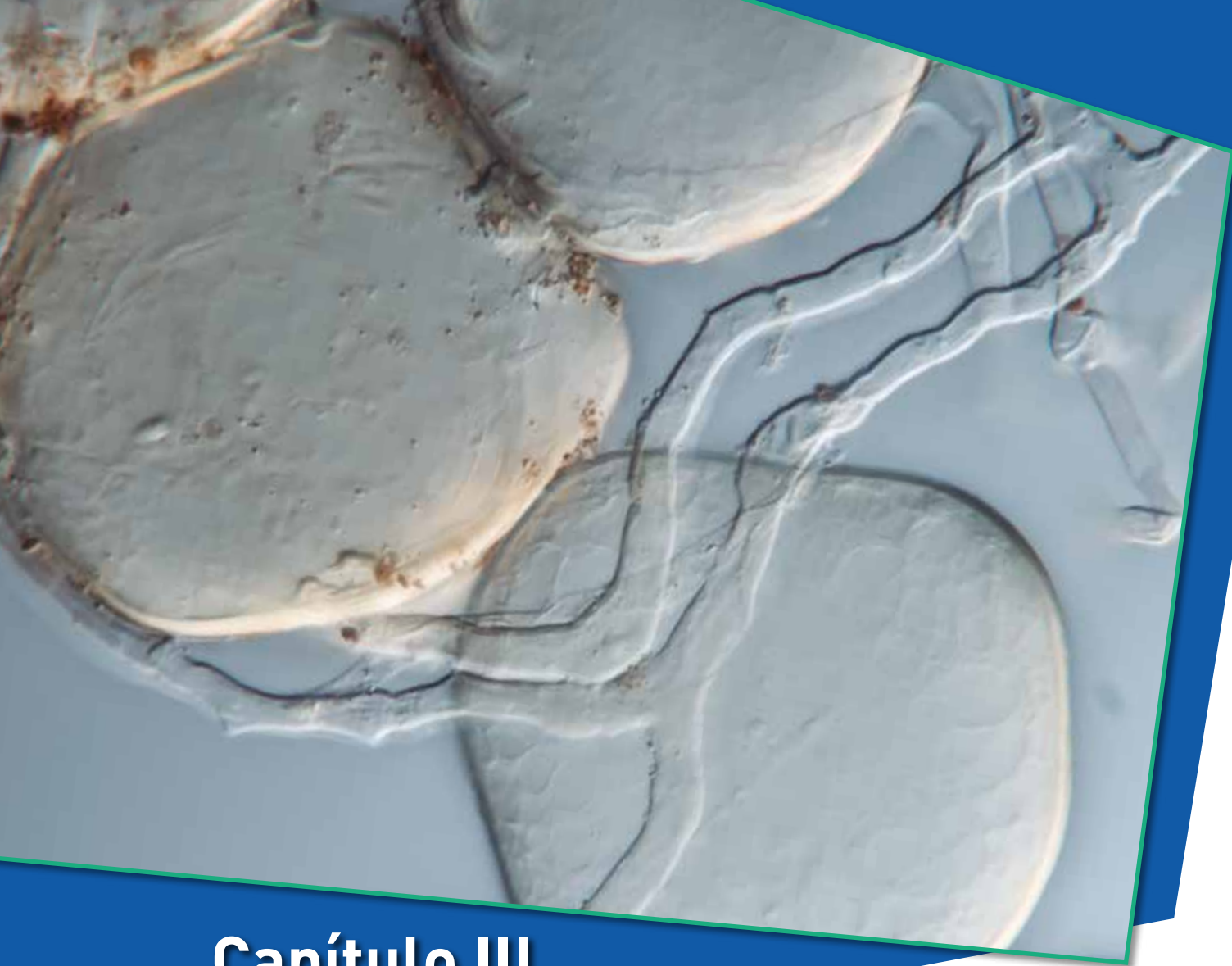
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*. ASM Press.
- Gülaydin, Ö., Ekin, I. H., Öztürk, C., İlhan, Z., & Ögün, E. (2019). Comparison of some bacterial identification methods. *Turkish Journal of Veterinary Research*, 3(1), 9-12. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tjvr/issue/44815/506998>
- Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2018). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101-106. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.003>
- Heckly, R. J., & Quay, J. (1981). A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations. *Cryobiology*, 18(6), 592-597. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90127-9)
- Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753-763. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.004>
- 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)
- Hunter-Cevera, J. C., & Belt, A. (eds.). (1996). *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-361946-4.x5000-5>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jurtshuk, P., & McQuitty, D. N. (1976). Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(5), 668-679. <https://doi.org/10.1128/AEM.31.5.668-679.1976>
- Kassama, Y., Rooney, P. J., & Goodacre, R. (2002). Fluorescent amplified fragment length polymorphism probabilistic database for identification of bacterial isolates from urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2795-2800. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2795-2800.2002>
- Kerckhof, F.-M., Courtens, E. N. P., Geirnaert, A., Hoefman, S., Ho, A., Vilchez-Vargas, R., Pieper, D. H., Jauregui, R., Vlaeminck, S. E., Van de Wiele, T., Vandamme, P., Heylen, K., & Boon, N. (2014). Optimized cryopreservation of mixed microbial communities for conserved functionality and diversity. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099517>
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S., & Yamanaka, K. (2002). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43(2), 143-149. <https://doi.org/10.1007/S102670200021>
- Krumnow, A. A., Sorokulova, I. B., Olsen, E., Globa, L., Barbaree, J. M., & Vodyanoy, V. J. (2009). Preservation of bacteria in natural polymers. *Journal of Microbiological Methods*, 78(2), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.05.017>

- Kupletskaya, M. B., & Netrusov, A. I. (2011). Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology*, 80(6), 850-853. <https://doi.org/10.1134/S0026261711060129>
- Liao, C.-H., & Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 45-50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>
- Liu, X., He, J., & Liao, C. (2016). Optimization of cryoprotectants to harvest high active cells of a *Scenedesmus*-lysing *Enterobacter* sp. during long-term preservation. *Algal Research*, 13, 298-302. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.014>
- Lloyd, D. H. (1994). The preservation and maintenance of living fungi, 2nd edition, D. Smith and A. H. S. Onions. *Veterinary Dermatology*, 5(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.1994.tb00033.x>
- Marian, M., & Seghezzi, W. (2013). Novel biopharmaceuticals: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and bioanalytics. En L. M. Plitnick, & D. J. Herzyk (eds.), *Nonclinical development of novel biologics, biosimilars, vaccines and specialty biologics* (pp. 97-137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394810-6.00004-6>
- Matsuno, T., & Yumoto, I. (2015). Bioenergetics and the role of soluble cytochromes *c* for alkaline adaptation in Gram-negative alkaliphilic *Pseudomonas*. *BioMed Research International*, 2015, artículo 847945. <https://doi.org/10.1155/2015/847945>
- Morales-García, Y. E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre Zúñiga, 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. [https://www.researchgate.net/publication/235901617\\_Bacterias\\_Preservadas\\_una\\_Fuente\\_Importante\\_de\\_Recursos\\_Biotecnologicos](https://www.researchgate.net/publication/235901617_Bacterias_Preservadas_una_Fuente_Importante_de_Recursos_Biotecnologicos)
- Moser, S. A., Mitchell, S. C., Ruby, J. D., Momeni, S., Osgood, R. C., Whiddon, J., & Childers, N. K. (2010). Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 599-602. <https://doi.org/10.1128/JCM.01828-09>
- Pankratova, G., Hederstedt, L., & Gorton, L. (2019). Extracellular electron transfer features of Gram-positive bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 1076, 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.007>
- Peiren, J., Buyse, J., De Vos, P., Lang, E., Clermont, D., Hamon, S., Bégau, E., Bizet, C., Pascual, J., Ruvira, M. A., Macián, M. C., & Arahal, D. R. (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: A coordinated study by European culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3.559-3.571. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6476-6>
- Philip, N., Garba, B., & Neela, V. K. (2018). Long-term preservation of *Leptospira* spp.: Challenges and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(13), 5.427-5.435. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9047-9>
- Polo, L., Mañes-Lázaro, R., Olmeda, I., Cruz-Pio, L. E., Medina, A., Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1.603-1.614. <https://doi.org/10.1111/jam.13465>

- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Reiner, K. (2010). *Catalase test protocol*. American Society for Microbiology. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3226>
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108-1114. <https://doi.org/10.1086/512818>
- Rodríguez, F., & Carvajal, F. O. (eds.). (2011). *Desarrollo de probióticos para ganaderías productoras de leche*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12951>
- Roger, V., Fonty, G., Andre, C., & Gouet, P. (1992). Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Current Microbiology*, 25(4), 197-201. <https://doi.org/10.1007/BF01570719>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2017). Useful microbial enzymes—An introduction. En G. Brahmachari (ed), *Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications* (pp. 1-11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>
- Sharma, R., Nimonkar, Y., Sharma, A., Rathore, R. S., & Prakash, O. (2018). Concept of microbial preservation: Past, present and future. En S. K. Sharma, & A. Varma (eds.), *Microbial resource conservation* (serie Soil Biology, vol. 54, pp. 35-54). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_2)
- Shields, P., & Cathcart, L. (2010). *Oxidase test protocol*. American Society for Microbiology. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3229>
- Shu, G., Hui, Y., Chen, S., Wan, H., & Chen, H. (2015). Application of plackett-burman design in screening freeze drying cryoprotectants for *Lactobacillus bulgaricus*. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle vi: Food Technology*, 39(1), 70-80. [https://www.researchgate.net/publication/284746538\\_Application\\_of\\_plackett-burman\\_design\\_in\\_screening\\_freeze\\_drying\\_cryoprotectants\\_for\\_Lactobacillus\\_bulgaricus](https://www.researchgate.net/publication/284746538_Application_of_plackett-burman_design_in_screening_freeze_drying_cryoprotectants_for_Lactobacillus_bulgaricus)
- Shu, G., Zhang, B., Hui, Y., Chen, H., & Wan, H. (2017). Optimization of cryoprotectants for *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying using Box-Behnken experimental design of response surface methodology. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(4), 256-263. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-07-960>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

- Smith, A. C., & Marise, A. H. (2019). *Gram stain protocols*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>
- Smith, D., & Ryan, M. (2012). Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *The Scientific World Journal*, 2012, artículo 805659. <https://doi.org/10.1100/2012/805659>
- Smith, D., Ryan, M. J., & Stackebrandt, E. (2008). The ex situ conservation of microorganisms: Aiming at a certified quality management. En *Encyclopedia of life support systems*. Unesco-Eolss. [https://www.researchgate.net/publication/266734069\\_The\\_ex\\_situ\\_conservation\\_of\\_microorganisms\\_aiming\\_at\\_a\\_certified\\_quality\\_management](https://www.researchgate.net/publication/266734069_The_ex_situ_conservation_of_microorganisms_aiming_at_a_certified_quality_management)
- Sone, N., Hägerhäll, C., & Sakamoto, J. (2004). Aerobic respiration in the Gram-positive bacteria. En D. Zannoni (ed.), *Respiration in archaea and bacteria* (pp. 35-62). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3163-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3163-2_2)
- Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Pasqualin Cavalheiro, C., Bartholomei Santos, M. L., Nabeshima, E. H., Copetti, M. V., & Fries, L. L. M. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. *LWT (Food Science and Technology)*, 89, 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.201711.011>
- Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the bio-control agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*, 94, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>
- Strasser, S., Neureiter, M., Gepl, M., Braun, R., & Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 167-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x>
- Tang, M., Waring, A. J., & Hong, M. (2007). Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. *Journal of Magnetic Resonance*, 184(2), 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2006.10.006>
- Taylor, W. I., & Achanzar, D. (1972). Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*, 24(1), 58-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380547/pdf/applmicro00048-0076.pdf>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7), artículo e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torres Higuera, L. D., Ortiz Ortega, D., Rodríguez Bautista, J. L., & Patiño Burbano, 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. [https://doi.org/10.21930/rctavol9\\_num2\\_art:120](https://doi.org/10.21930/rctavol9_num2_art:120)
- Towey, J. J., Soper, A. K., & Dougan, L. (2012). Molecular insight into the hydrogen bonding and micro-segregation of a cryoprotectant molecule. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(47), 13.898-13.904. <https://doi.org/10.1021/jp3093034>

- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). *Microbiology and molecular diagnosis in pathology*. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128053515/microbiology-and-molecular-diagnosis-in-pathology#book-info>
- Wolkers, W. F., & Oldenhof, H. (eds.). (2015). *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (3.<sup>a</sup> ed.). Humana Press.
- World Federation for Culture Collections (wfcc). (2010). *World Federation for Culture Collections guidelines. For the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*. <http://www.wfcc.info/guidelines/>
- Yamazaki, K., Okubo, T., Inoue, N., & Shinano, H. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of the spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(6), 1016-1018. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1016>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *bmc Bioinformatics*, 17(1), artículo 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Zhang, J., Liu, Q., Chen, W., Du, G., & Chen, J. (2016). Short communication: Protection of lyophilized milk starter *Lactobacillus casei* Zhang by glutathione. *Journal of Dairy Science*, 99(3). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9540>
- Zhao, G., & Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333-338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>



## Capítulo III

*Rhizoglosum irregulare*, CMIB ↑

66

### Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes (CMIB)

Paola J. Criollo-Campos  
Urley A. Pérez-Moncada  
Germán A. Estrada-Bonilla  
Ruth R. Bonilla Buitrago

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Autor de correspondencia: Germán A. Estrada-Bonilla; correo electrónico: [gaestrada@agrosavia.co](mailto:gaestrada@agrosavia.co)

La CMIB está conformada por 353 accesiones bacterianas y 25 accesiones de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA). Para su mantenimiento a través del tiempo, se han realizado estudios con diferentes técnicas de preservación a largo plazo, estableciendo protocolos que permiten una mayor estabilidad en la viabilidad y actividad biológica de las cepas de microorganismos (Rojas-Tapias et al., 2012). La mayoría de los métodos de conservación y mantenimiento de los materiales empleados en la actualidad requieren sistemas de almacenamiento sofisticados que implican grandes inversiones de dinero y material (Rojas-Tapias et al., 2013); sin embargo, son metodologías necesarias para garantizar el buen funcionamiento y la preservación del germoplasma. Adicionalmente, se bioprospecta que los microorganismos que conforman la colección sean utilizados como principios activos para el desarrollo de inoculantes biológicos.

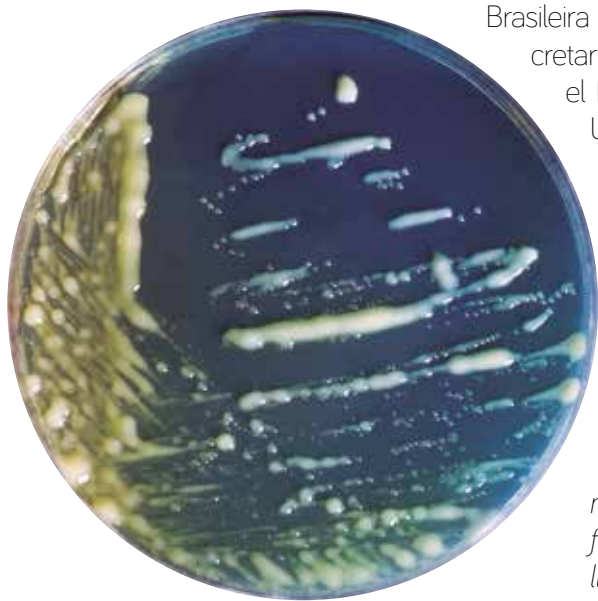
En la CMIB se estudia la capacidad de las accesiones como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) al tener varios mecanismos fenotípicos que mejoran el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta colección posee bacterias que ayudan a suplir los requerimientos nutricionales de las plantas, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P), por medio de actividades como la fijación biológica de N (FBN, realizada por bacterias simbióticas y asimbióticas), la solubilización de fuentes insolubles de P y la producción de fitohormonas (Goswami et al., 2016). De acuerdo con varios autores, se conocen mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal (Goswami et al., 2016; Jeyanthi & Kanimozhi, 2018; Singh, 2018). Los mecanismos directos se relacionan con la solubilización de P, la fijación de N, la producción de fitohormonas de tipo auxinas y giberelinas o la regulación de la producción de hormonas por parte de la planta (Ahmad et al., 2008; Vimal et al., 2017), y los mecanismos indirectos están relacionados con la resistencia sistémica inducida y la producción de sideróforos, de quitinasas, de antibióticos y de ACC desaminasa (Goswami et al., 2016; Jeyanthi & Kanimozhi, 2018; Singh, 2018).

El uso de PGPB representa una alternativa ecológica sustentable (Obando Castellanos et al., 2010), por lo que se considera ideal para incrementar el rendimiento de las plantas de interés agroindustrial. Las PGPB participan directamente en los ciclos biogeoquímicos, mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes. Además, indirectamente, pueden contribuir con la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos, el control biológico de enfermedades y la producción de antibióticos y sideróforos (López-Ortega et al., 2013; Pii et al., 2015; Sanchez López et al., 2014).

La colección también cuenta con HFMA, microorganismos biótrofos obligados que se asocian aproximadamente a un 71 % de las plantas terrestres (Brundrett & Tedersoo, 2018); esta asociación es ampliamente conocida por ser una de las estrategias más antiguas y extendidas para aumentar la tolerancia a estreses bióticos (Hildebrandt et al., 2007) y abióticos en las plantas (García et al., 2016; Girma, 2015; Zhang et al., 2014). Debido a su naturaleza biotrófica, el desarrollo de métodos de propagación para obtención de inóculos de alta calidad es un desafío (Ijdo et al., 2011); en ese sentido, en varias investigaciones se ha observado que, aunque estos hongos no son específicos, tienen cierta afinidad con algunas especies de plantas, algunas de las cuales pueden ser más sensibles a la colonización que otras (Bonfante & Genre, 2008; Engqvist et al., 2006), y esta respuesta puede depender tanto de la planta hospedera como del HFMA empleado (Jin et al., 2013). Por lo anterior, es necesario investigar la respuesta de diferentes especies de plantas a la inoculación con HFMA, en diferentes sustratos, para obtener inóculos de calidad.

## Distribución y géneros encontrados

Algunas de las accesiones de la CMIB fueron colectadas en 16 departamentos del país, a partir de 1976 (figura 6); otras fueron adquiridas mediante donaciones de diferentes centros de investigación a nivel mundial, como la Universidad de Wisconsin-Madison, la Universidad de Malaya, la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), la Secretaría de Agricultura & Suelos y el Ipea (Brasil), el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la Universidad de Sídney, la Universidad Estatal de Carolina del Norte y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina, y un gran número de accesiones son provenientes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

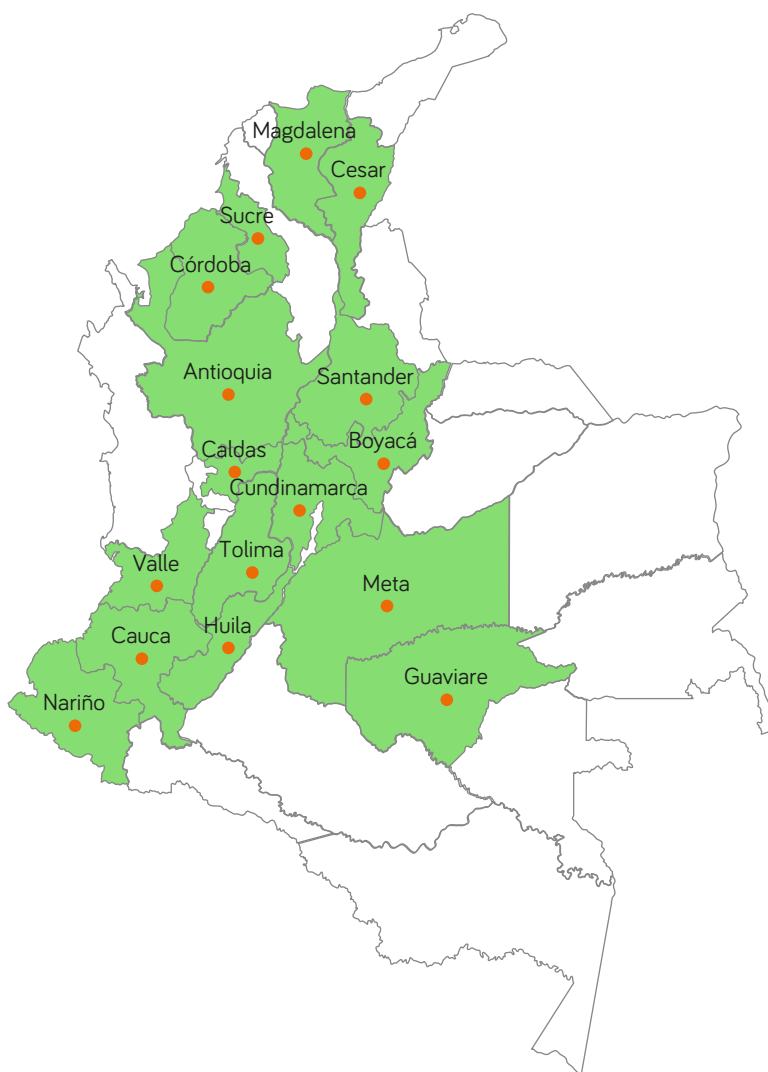


*Bradyrhizobium diazoefficiens*, CMIB ↑

Las cepas bacterianas fueron aisladas principalmente de raíces noduladas de diferentes leguminosas, como soja (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium repens*) y arveja (*Pisum sativum*), entre otras, y a partir de suelo rizosférico de cultivos de interés agrícola para el país, como

algodón (*Gossypium* sp.), pasto guinea (*Megathyrsus maximus*) y kikuyo (*Cenchrus clandestinum*).

Con ayuda de las herramientas moleculares, se han identificado las accesiones bacterianas y se han encontrado los siguientes géneros: *Brevundimonas* sp., *Gordonia* sp., *Klebsiella* sp., *Knoellia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Herbaspirillum* sp., *Sinorhizobium* sp., *Pantoea* sp., *Agrobacterium* sp., *Leifsonia* sp.,



**Figura 6.** Los 16 departamentos en los que se realizaron colectas de material biológico.

Fuente: AGROSAVIA, equipo CMIB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca



Respecto a los HFMA, algunas accesiones fueron colectadas de dos departamentos de Colombia (Magdalena y Cundinamarca), y un gran número de ellas son provenientes del CIAT. Todas las accesiones han sido identificadas mediante el empleo de claves taxonómicas vigentes, y se obtuvieron los siguientes géneros: *Rhizoglomus* sp., *Glomus* sp., *Acaulospora* sp., *Denticustata* sp., *Paraglomus* sp., *Claroideoglomus* sp., *Gigaspora* sp., *Cetraspora* sp., *Diversispora* sp., *Dentiscutata* sp. y *Kuklospora* sp.

## Métodos de conservación empleados en la CMIB

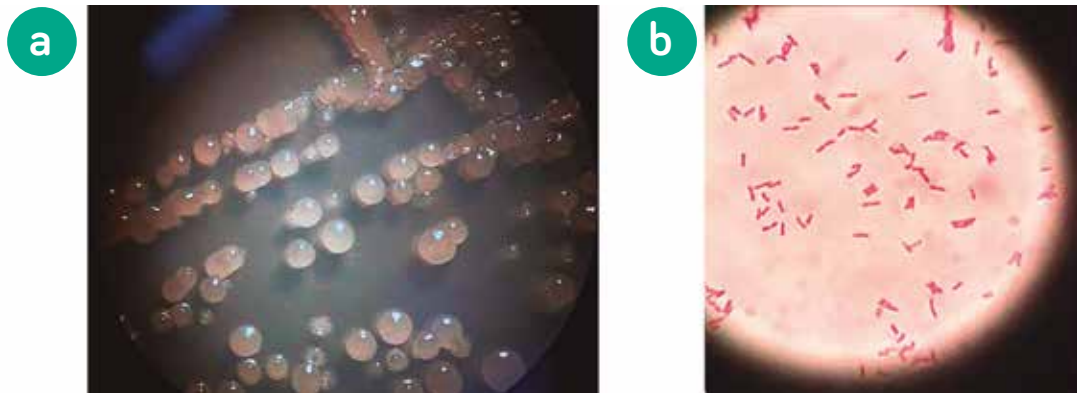
Son diversos los métodos que se han implementado en la CMIB, donde cada grupo de microorganismos ha requerido una determinación específica de las mejores condiciones para su conservación. A continuación se presentan los aspectos más relevantes sobre la conservación de los diferentes tipos de microorganismos con interés en biofertilizantes.

### Conservación de las accesiones bacterianas

La CMIB inicialmente se enfocó en la conservación de accesiones bacterianas que cumplieran la función de fijar el nitrógeno atmosférico, pero luego se llegó a la determinación de estudiar actividades como solubilización de P y producción de indoles. Las técnicas de conservación han ido evolucionando paulatinamente, y en este momento se utilizan metodologías de largo plazo que garantizan la viabilidad de las cepas hasta por 20 años.

### Crecimiento de las accesiones bacterianas

Las cepas son reactivadas sobre el medio de cultivo agar nutritivo (composición en g/L: peptona: 5; extracto de carne: 3; cloruro de sodio: 8, y agar: 15) y el medio de cultivo YMA (*yeast mannitol agar*), para rizobios, mediante siembra por agotamiento (composición en g/L: manitol: 10;  $K_2HPO_4$ : 0,1;  $KH_2PO_4$ : 0,4;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2; NaCl: 0,1; extracto de levadura: 0,5; rojo congo: 10 mL al 0,25 % [p/v], y agar: 15). Posteriormente, las cajas de medios de cultivo sembradas son incubadas entre 24 y 120 horas a  $30 \pm 2$  °C, dependiendo del tipo de microorganismo (p. ej., *Rhizobium*, 24 horas, y *Bradyrhizobium*, 120 horas). La verificación de la viabilidad se realiza visualmente, confirmando el crecimiento, evidenciando la presencia de un solo tipo de morfología en la caja de Petri y mediante tinción diferencial de Gram (figura 8).



**Figura 8.** Acceso de la CMIB verificada por su viabilidad y pureza. **a.** Crecimiento sobre el medio de cultivo agar nutritivo (en estereoscopia); **b.** Tinción diferencial de Gram (Gram-negativa, objetivo de 100x).

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Paola J. Criollo-Campos

### Congelación y liofilización de las accesiones bacterianas

Una vez reactivadas las cepas y luego de verificar su pureza, se realiza su conservación mezclándolas con una solución crioprotectante de medio de cultivo: glicerol (1:1) (Sivasithamparame et al., 2004). El protectante es adicionado a la biomasa reactivada y mezclado en la caja de Petri o tubo de ensayo. La suspensión se deposita en crioviales de 1,5-2,0 mL, los cuales son almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador. Después de este proceso, se verifica la viabilidad sobre un medio de cultivo sólido en caja de Petri.

En el proceso de liofilización se emplea la metodología reportada por Hungria et al. (2016), modificada. Se realiza la mezcla de la biomasa con una solución de gelatina y sacarosa (10:1), distribuyendo 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión en viales de vidrio de borosilicato; la suspensión se congela a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los viales se colocan en el liofilizador, donde se someten a las siguientes condiciones: temperatura de núcleo:  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; presión: 1 hPa; tiempo de secado: 24 horas; programa de secado: 5 horas a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 horas a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 horas a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 9 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Conservación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA)

Los HFMA, al ser biótrofos obligados, no son tan fácilmente cultivables en medios de cultivo sintéticos, por lo que tienen que ser propagados mediante el crecimiento de plantas trampa que se siembran en sustratos como suelo,

perlita o arena, entre otros, los cuales son debidamente esterilizados y utilizados en condiciones de invernadero. Smith y Onions (Lloyd, 1994) han descrito diferentes procedimientos para preservar y almacenar hongos: algunos de ellos son el de crecimiento continuo y los que retrasan la necesidad de subcultivos, como el almacenamiento en el propio medio de crecimiento en el refrigerador o congelador bajo aceite o agua. Un centro referente, la International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Invam), ha usado este método en la mayoría de sus accesiones desde 1990. De acuerdo con el Invam (s. f.), la duración de almacenamiento varía entre géneros y su preservación es exitosa si se multiplican cada año para mantener su viabilidad.

### Conservación de HFMA en refrigeración

Es necesario preservar los HFMA cada año para mantener su viabilidad; para esto, se toma una porción de inóculo y se multiplica bajo condiciones de invernadero con una planta hospedera. En la CMIB se ha usado uchuva (*Physalis peruviana*), kudzú (*Pueraria phaseoloides*), cebolla de bulbo (*Allium cepa*) y pasto barrera (*Brachiaria decumbens*) en sustrato estéril (suelo + arena cuarítica) durante 4 meses; luego de este tiempo, las plantas son sometidas a estrés hídrico por 15 días, y finalmente se corta la parte aérea de la planta y se realiza un control de calidad siguiendo la metodología descrita por Gerde-mann y Nicolson (1963). Los inóculos que presenten las condiciones adecuadas de pureza (> 80 %) son guardados en bolsas selladas que posteriormente son almacenadas a 4 °C (figura 9).

*Azospirillum brasilense*, CMIB →





**Figura 9.** Método de conservación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en nevera a 4 °C en su propio medio de multiplicación (suelo + arena cuarcítica).

Fuente: Archivo CMB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Autenticación de cepas

Para la autenticación de cepas en la colección, se pueden emplear los métodos utilizados para las PGPB, los cuales tienen en cuenta las características asociadas a dicho grupo: la solubilización de fósforo, la producción de indoles totales y la fijación de nitrógeno. Por otra parte, para la autenticación de los HFMA, se tienen en cuenta los métodos de determinación del porcentaje de colonización en raíces y la identificación morfológica de esporas.

## Caracterización de las accesiones bacterianas

Las PGPB promueven el crecimiento, y su uso en la promoción y protección del desarrollo vegetal es una práctica ampliamente implementada en la agricultura (Patel & Saraf, 2017; Rojas-Tapias et al., 2012; Romero-Perdomo et al., 2017). Las ventajas que confieren estos microorganismos a la planta van desde al aumento en la toma de macro y micronutrientes, la promoción de la tasa de división celular, observada en el aumento de biomasa radical y foliar, hasta la protección contra estreses bióticos y abióticos (Moreno-Galván et al., 2020; Ngumbi & Kloepper, 2016; Rojas-Tapias et al., 2012; Romero-Perdomo et al., 2017).

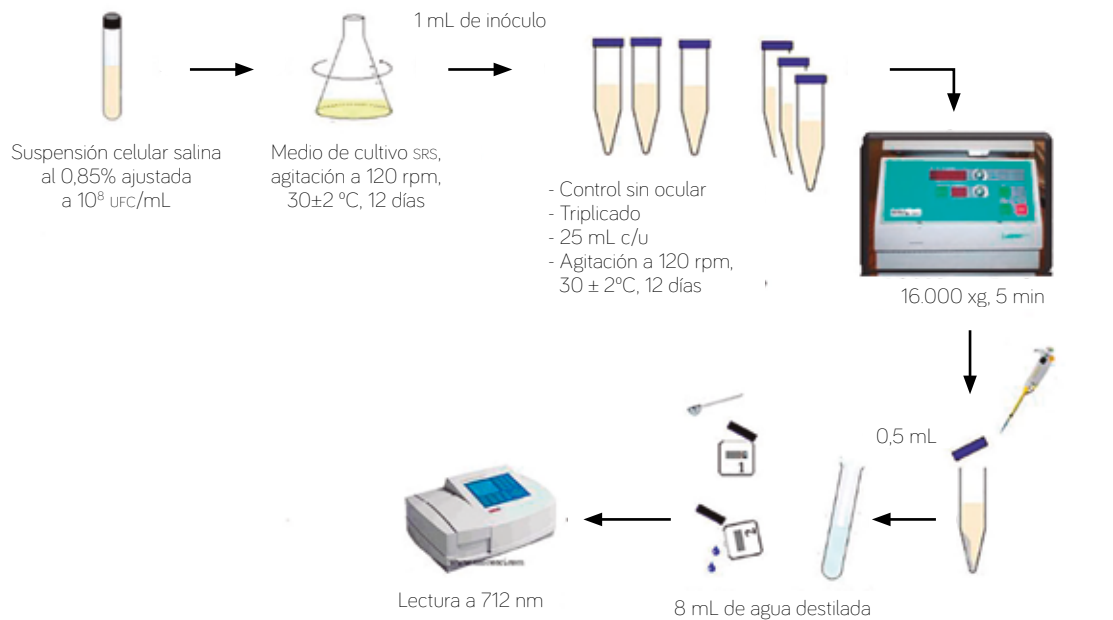
El nitrógeno y el fósforo son los nutrientes más importantes para el desarrollo y la producción de las plantas, pues participan en procesos bioquímicos fundamentales para su adecuado desarrollo (Oldroyd & Leyser, 2020). Si bien la adición de fertilizantes es una fuente importante de N para los cultivos agrícolas, los procesos biológicos como la FBN contribuyen con más de la mitad de la demanda total del nitrógeno (Angus & Grace, 2017). Estimaciones globales muestran que la FBN terrestre total puede llegar a 128 Tg de N al año (Vitousek et al., 2013), y en ecosistemas agrícolas está en el orden de 4-55 Tg de N al año (Herridge et al., 2008). La reducción del  $N_2$  atmosférico a  $NH_3$  es realizada a través del complejo enzimático nitrogenasa, presente principalmente en bacterias simbióticas y asimbióticas (Gaby & Buckley, 2011).

Por otro lado, el fósforo es un nutriente clave para la producción agrícola. A pesar de ser abundante en la mayoría de los suelos, su disponibilidad es baja para las plantas, pues es fácilmente absorbido por complejos minerales en el suelo. La baja eficiencia del fósforo aplicado en los fertilizantes solubles (10-30 %) hace que sea el nutriente que se aplique en mayor cantidad (White, 2009). La aplicación de PGPB eficientes solubilizando y mineralizando el fósforo presente en la rizosfera es una alternativa prometedora y con bajo impacto ambiental para aumentar la eficiencia de los fertilizantes minerales fosfatados aplicados, además de que proporciona rentabilidad y sustentabilidad (Estrada et al., 2013; López-Ortega et al., 2013).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la capacidad biológica de fijación y disposición de diferentes elementos y compuestos es clave en el proceso de caracterización de las cepas bacterianas que están o van a ser depositadas en la CMIB. A continuación se describen los métodos utilizados por el grupo de curadores de la colección para caracterizar las bacterias con interés en biofertilizantes.

### Solubilización de fósforo

La determinación del fósforo liberado por las cepas se lleva a cabo en el medio líquido SRS (composición en g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,8;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2;  $\text{CaSO}_4$ : 0,1;  $\text{MoO}_3$ : 0,001; sacarosa: 5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,04, y azul de bromotimol: 0,5) (Sundara Rao & Sinha, 1963), suplementado con fosfato tricálcico  $-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2-$  al 5 % (p/v). Los ensayos son realizados por triplicado. Los inóculos son ajustados en solución de NaCl (0,85 % [p/v])  $\text{DO}_{600} = 0,500$  (aproximadamente  $10^8$  células/mL). Luego, se inocula 1 mL de la suspensión bacteriana en 10 mL del medio SRS en erlenmeyer de 50 mL. La incubación se lleva a cabo a  $30 \pm 2$  °C por 12 días con agitación constante a 120 rpm (Estrada et al., 2013). Al final de este periodo, el fósforo soluble se cuantifica con el método de azul de fosfomolibdeno, usando una absorbancia de 712 nm (Murphy & Riley, 1962; Watanabe & Olsen, 1965). Previamente, se realiza una curva estándar con concentraciones conocidas de 0, 4, 8, 10, 15, 20, 100 y 150 mg/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (figura 10).

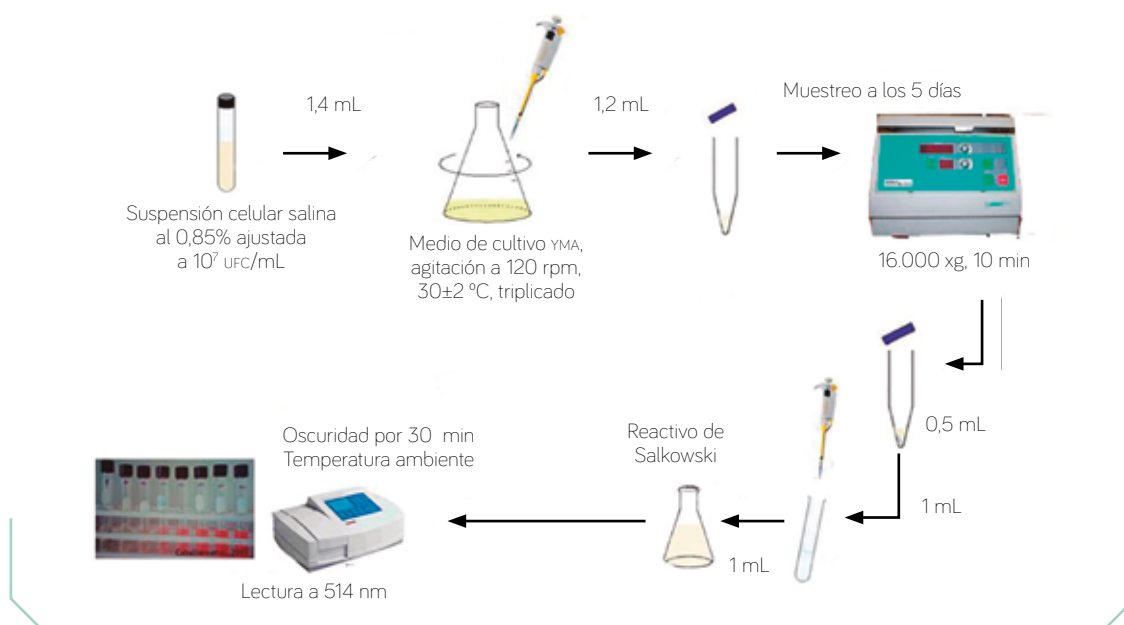


**Figura 10.** Metodología empleada para la determinación *in vitro* de la capacidad de las accesiones bacterianas pertenecientes al banco de germoplasma de solubilizar fuentes fosfatadas.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Mauricio Camelo Rusinque

## Producción de indoles totales

La producción de indoles es determinada a partir de la fermentación líquida en el medio de cultivo YMA suplementado con triptófano (100 µg/mL); se toma 1 mL de cultivo y se centrifuga a 16.000 xg durante 6 minutos; posteriormente, se reaccionan 100 µL del sobrenadante con 100 µL del reactivo de Salkowski en placas Elisa. La reacción se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y en completa oscuridad; todas las muestras se realizan por triplicado. Una vez pasado el tiempo de reacción, se determina la absorbancia en un espectrofotómetro a 514 nm. Con los datos de absorbancia, se obtiene el promedio de las réplicas y se reemplazan los datos en la ecuación de la recta de la curva patrón, para determinar la producción de indoles totales (Carreño-Lopez et al., 2000; Glickmann & Dessaux, 1995). Previamente, se realiza una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 mg/L de ácido 3 indolacético (figura 11).



**Figura 11.** Metodología empleada para la determinación *in vitro* de la capacidad de las accesiones bacterianas pertenecientes al banco de germoplasma de producir sustancias tipo indol.

Fuente: Archivo CIMB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Mauricio Camelo Rusinque

## Fijación biológica de nitrógeno

Se evalúa la capacidad de las accesiones bacterianas para fijar N, mediante la nodulación de plantas trampa pertenecientes a frijol caupí (*Vigna unguiculata*). Esta planta es seleccionada por ser la hospedera de un amplio rango de rizobios (Broughton, 2003). Las semillas de *V. unguiculata* son pregerminadas en sustrato estéril de vermiculita + arena (2:1) durante 48 horas; posteriormente, las semillas germinadas se siembran en bolsas plásticas con capacidad de 2 kg, que contienen el mismo sustrato estéril. Las accesiones bacterianas se multiplican en caldo YMA durante el tiempo requerido para cada microorganismo (concentración:  $\pm 10^8$  UFC/mL, y se inoculan 5 mL de cada inóculo a las semillas. El experimento es realizado bajo condiciones semicontroladas, en invernadero, durante 60 días. Posteriormente, se realiza un muestreo para verificar nodulación en las 3 repeticiones establecidas. Seguidamente, se realiza la prueba de ARA (*acetylene reduction assay*) a las raíces noduladas siguiendo la metodología reportada por Grove y Malajczuk (1987). Las raíces noduladas se introducen en frascos herméticamente cerrados con un volumen de 280 mL, a los cuales se le sustituye el 10 % (v/v) de la atmósfera (28 mL) con acetileno, y se incuban durante una hora a 32 °C. La concentración de etileno se cuantifica inyectando 1 mL de la atmósfera del frasco en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies GC-FID 7890<sup>a</sup>), columna HayeSep N (20 pies, 1/8 pulgada, 2 mm), flujo N<sub>2</sub> 20 mL/min (gas arrastre).

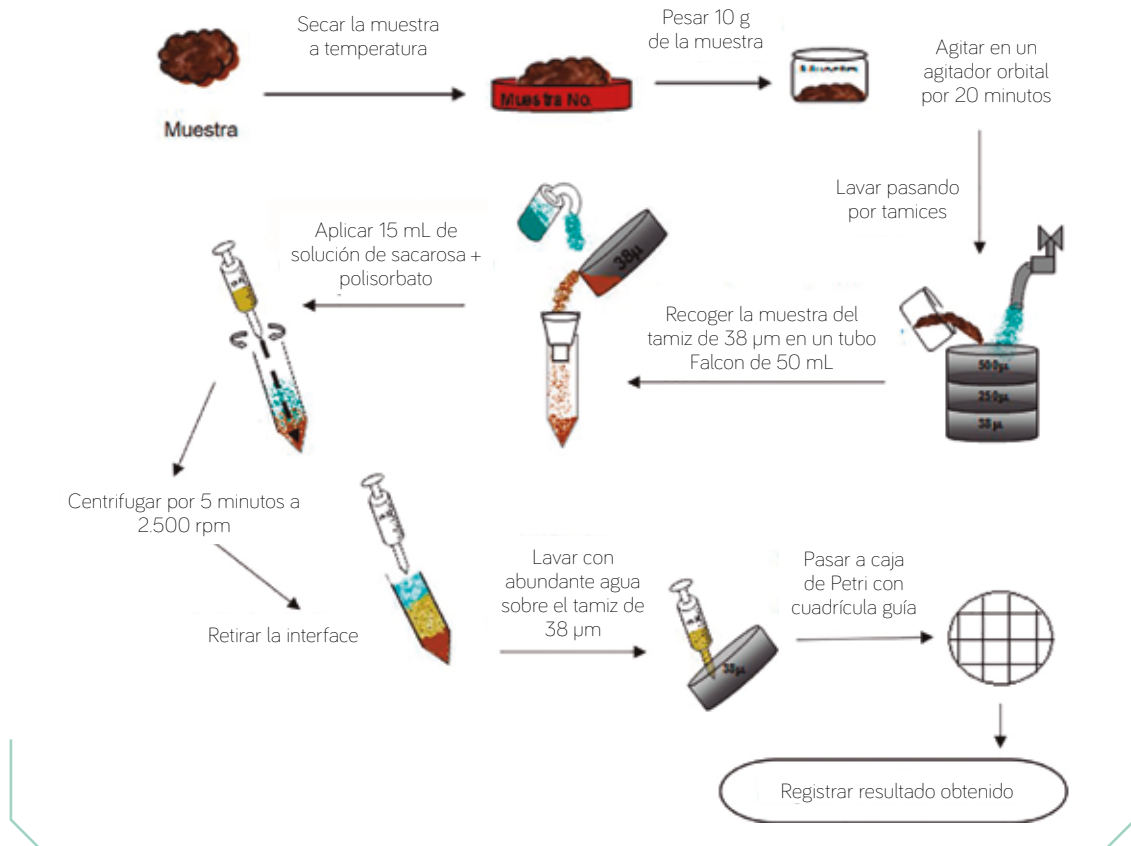
## Caracterización de HFMA

Los HFMA contribuyen de manera sostenible en la fertilización de los cultivos de importancia agronómica del país, por lo cual es necesario conocer su potencial biofertilizante para contrarrestar el impacto derivado del uso de sustancias agroquímicas. A continuación se presentan los procedimientos necesarios para el aislamiento y la identificación de los HFMA con interés en biofertilizantes.

## Aislamiento y cuantificación de HFMA

Para el aislamiento y la cuantificación de HFMA, se utiliza el método de flotación en un gradiente de sacarosa, en el cual las esporas quedan suspendidas en la interfaz del gradiente después de la centrifugación. Adicionalmente, se utiliza polisorbato, un agente que ayuda a disgregar partículas de materia orgánica para liberar las esporas que se encuentran atrapadas en este gradiente. Este método permite realizar la observación y conteo de esporas de HFMA, y para esto se necesita que el suelo que se va a procesar se haya secado a

temperatura ambiente. Las esporas son extraídas a partir de 10 g de suelo y se pasan por tamices de 500, 250 y 38  $\mu\text{m}$ , con el fin de separar la materia orgánica; luego, las muestras son centrifugadas a 4.000 xg durante 5 minutos en 15 mL de solución de sacarosa al 70 % (p/v); posteriormente, se saca la interfaz formada y se deposita en el tamiz de 38  $\mu\text{m}$  para retirar los restos de la solución de sacarosa, para finalmente depositarla en una caja de Petri para su posterior observación en estereoscopio (figura 12) (Gerdemann & Nicolson, 1963).



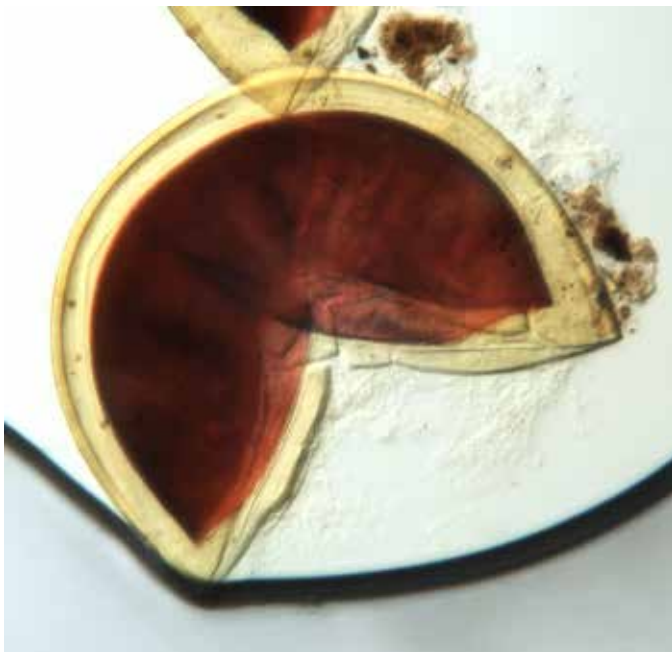
**Figura 12.** Método para el aislamiento de esporas de HFMA a partir de muestras de suelo.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Diana Paola Serralde

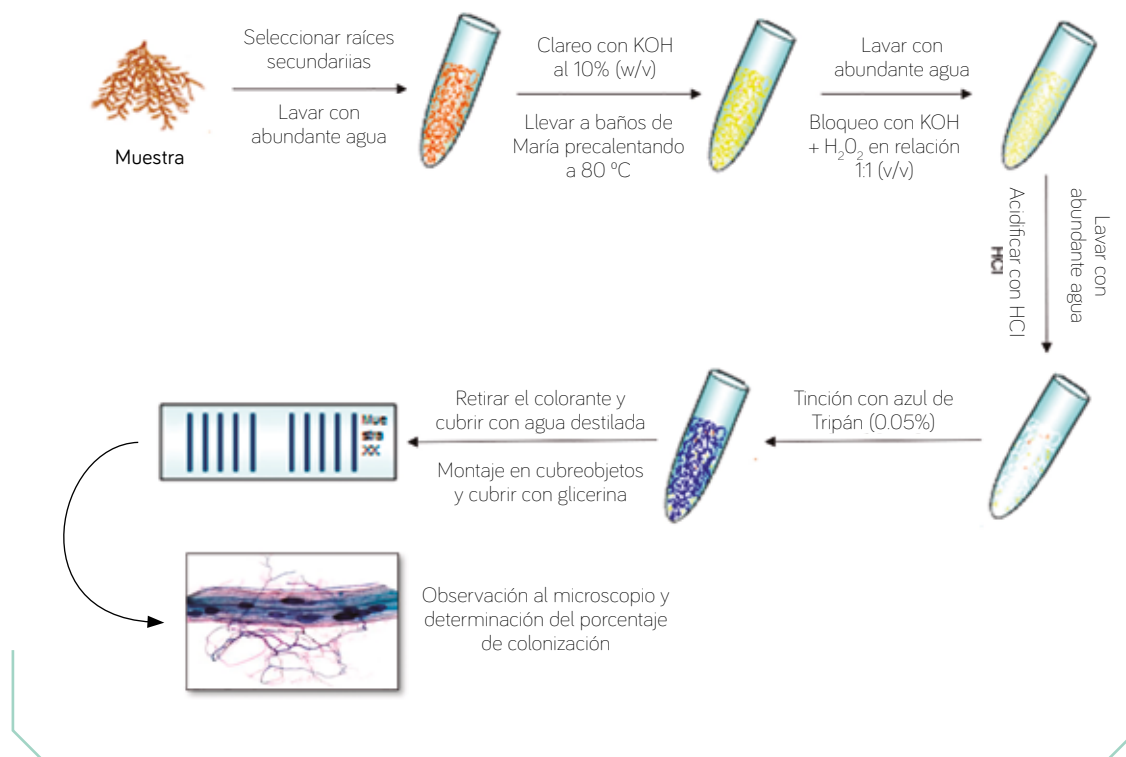
### Determinación del porcentaje de colonización en raíces micorrizadas

Las técnicas para observar y cuantificar las diferentes estructuras (hifas, vesículas, arbuscúlos y esporas) de los HFMA son esenciales para su estudio (Vierheilig & Piché, 2002). El método de tinción propuesto por Phillips y Hayman (1970) determina el porcentaje de micorrización a partir de muestras de raíz montadas en láminas; este porcentaje determina el número total de campos (intersección entre la raíz y un transecto horizontal) y el número de campos micorrizados. Para estimar el porcentaje de estructuras intrarradicales de los HFMA, se toma una submuestra de raíces finas antes de que sean secados; estas se deben lavar muy bien para retirar partículas de suelo adheridas, y luego se someten a una serie de reactivos (KOH, KOH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HCl) que permiten aclarar la raíz. El tiempo que están los fragmentos de raíces en las diferentes soluciones químicas va a depender de las raíces que se tiene; por ejemplo, para el caso de raíces muy gruesas, como de forestales, el tiempo aproximado es de 15 minutos en cada solución, pero, en términos generales, el tiempo de exposición oscila entre 7 y 10 minutos. Después de la aplicación del HCl, las raíces son teñidas con azul de tripán al 0,05 % (p/v). El cálculo de los porcentajes de colonización se realiza a partir de 10 fragmentos (aproximadamente de 15 mm de longitud) de raíces para cada planta, como se muestra en la figura 13.

80



← *Kuklospora colombiana*, CMIB



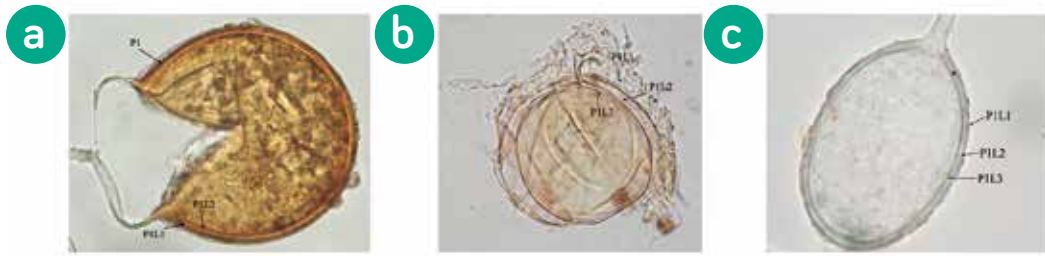
**Figura 13.** Método para la estimación del porcentaje de colonización a partir de fragmentos de raíces.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Diana Paola Serralde

## Identificación morfológica de esporas de HFMA

Las accesiones de HFMA presentes en la CMIB son caracterizadas morfológicamente a partir de esporas, teniendo en cuenta caracteres morfológicos básicos, como forma, tamaño, color, hifa suspensora, estructura de germinación, formación de escudo y láminas, y número de paredes, que se mencionan a continuación según los diferentes géneros:

- *Glomus*, *Funneliformis*, *Septoglomus*, *Simiglomus*, *Claroideoglomus*, *Albahypha*, *Viscospora*, *Diversispora*, *Redeckera*, *Paraglomus* y *Rhizoglomus* tienen solo una pared con dos o más láminas (figura 14).

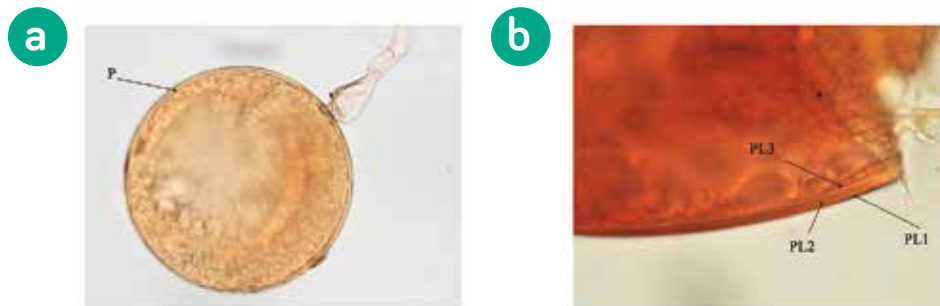


**Figura 14.** Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB. **a.** *Claroideoglossum etunicatum*; **b.** *Rhizoglossum irregulare*; **c.** *Paraglossum occultum*.

Nota: P: pared; L: lámina. Las esporas fueron observadas en microscopio a 40x.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Urley A. Pérez-Moncada

- *Gigaspora* tiene una pared de tres capas o láminas, y una de estas capas es germinal interna verrugosa (figura 15).

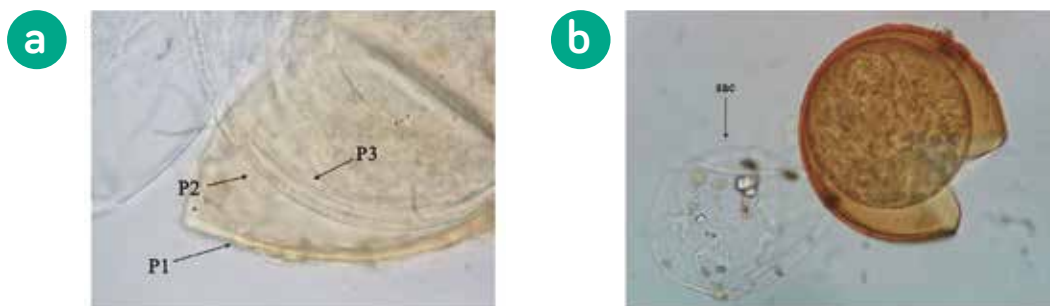


**Figura 15.** Esporas de una *Gigaspora rosea* perteneciente a la CMIB. **a.** Espora montada en PVLG; **b.** Espora montada en PVLG + Melzer.

Nota: P: pared; L: lámina. Las esporas fueron observadas en microscopio a 40x.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Urley A. Pérez-Moncada

- *Pacispora*, *Entrophospora*, *Otospora* y *Tricispora* tienen dos paredes, y su pared exterior cuenta con tres o cuatro láminas.
- *Archaeospora trappei* y *Artrospora schenckii* tienen dos paredes, y su pared exterior es delgada y solo tiene dos capas.
- *Acaulospora* y *Kuklospora* tienen tres paredes: la pared exterior tiene tres láminas, la pared media es delgada, con una o dos láminas, y la pared interna es germinal, tiene dos o tres láminas, es perlada y podría reaccionar al Melzer (figura 16).

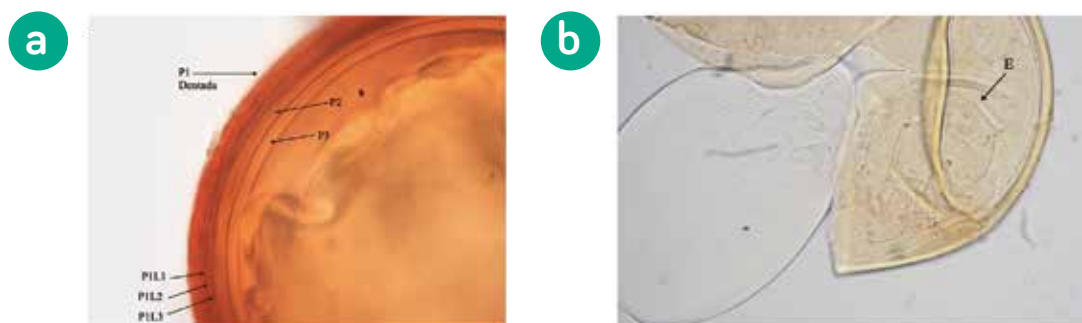


**Figura 16.** Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB. **a.** *Acaulospora rugosa*; **b.** *Kuklospora colombiana*.

Nota: P: pared; sac.: sáculo. Las esporas fueron observadas en microscopio a 100x y 40x, respectivamente.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Urley A. Pérez-Moncada

- *Saculospora* tiene tres paredes.
- *Ambispora* spp. tienen tres paredes grandes, gruesas y sin perlas en la pared interna.
- *Scutellospora*, *Orbispora*, *Cetraspora*, *Racocetra*, *Fuscutata*, *Dentiscutata*, *Quatunica*, *Intraorantospora* y *Paradentiscutata* tienen de dos a cuatro paredes: la pared externa tiene dos o tres láminas, y la pared media tiene una o dos láminas. Además, presentan escudo de germinación en la parte superior de la pared más interna (figura 17).



**Figura 17.** Esporas de HFMA pertenecientes a la CMIB. **a.** *Dentiscutata heterogama*; **b.** *Cetraspora pellucida*.

Nota: P: pared; E: escudo. Las esporas fueron observadas en microscopio a 100x.

Fuente: Archivo CMIB, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Urley A. Pérez-Moncada

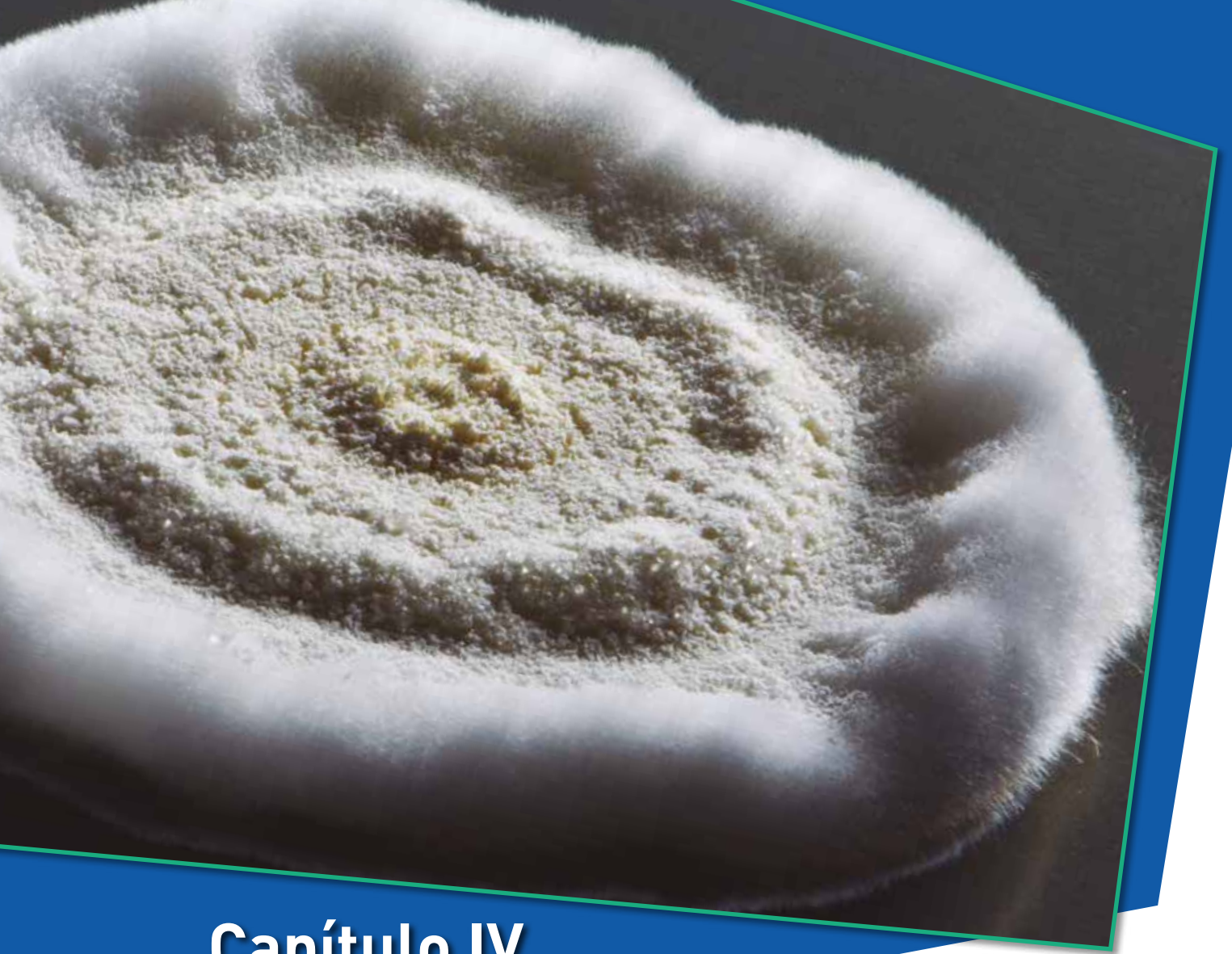
## Referencias

- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Angus, J. F., & Grace, P. R. (2017). Nitrogen balance in Australia and nitrogen use efficiency on Australian farms. *Soil Research*, 55(6), 435-450. <https://doi.org/10.1071/SR16325>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: An evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*, 13(9), 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.07.001>
- Broughton, W. J. (2003). Roses by other names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology*, 185(10), 2.975-2.979. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.2975-2979.2003>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1.108-1.115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., & Baca, B. E. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular Genetics and Genomics*, 264(4), 521-530. <https://doi.org/10.1007/s004380000340>
- Engqvist, L. G., Mårtensson, A., Orłowska, E., Turnau, K., Belimov, A. A., Borisov, A. Y., & Gianinazzi-Pearson, V. (2006). For a successful pea production on polluted soils, inoculation with beneficial microbes requires active interaction between the microbial components and the plant. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 56(1), 9-16. <https://doi.org/10.1080/09064710510029169>
- Estrada, G. A., Divan Baldani, V. L., De Oliveira, D. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, 369(1-2), 115-129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>
- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2011). A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1.790-1.799. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02488.x>
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S. D., Wipf, D., & Courty, P.-E. (2016). Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in Plant Science*, 21(11), 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235-244. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)

- Girma, G. (2015). Microbial bioremediation of some heavy metals in soils: An updated review. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 7(1), 29-45. <https://doi.org/10.21608/eajbsg.2015.16483>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), artículo 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Grove, T., & Malajczuk, N. (1987). Nitrogen fixation (acetylene reduction) by forest legumes: Sensitivity to pre-harvest and assay conditions. *New Phytologist*, 106(1), 115-127. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04795.x>
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1-2), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.023>
- Hungria, M., Ardley, J., O'Hara, G., & Howieson, J. G. (2016). Preservation of rhizobia. En J. G. Howieson, & M. J. Dilworth (eds.), *Working with rhizobia* (pp. 61-71). Australian Centre for International Agricultural Research.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: Past, present, and future. *Mycorrhiza*, 21, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0337-z>
- International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. (s. f.). *Refrigeration storage (4 °C)* [método]. <https://invam.wvu.edu/methods/inocula-storage/refrigeration-storage>
- Jeyanthi, V., & Kanimozhi, S. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) – Prospective and mechanisms: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2). <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.2.34>
- Jin, H., Germida, J. J., & Walley, F. L. (2013). Impact of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants on subsequent arbuscular mycorrhizal fungi colonization in pot-cultured field pea (*Pisum sativum* L.). *Mycorrhiza*, 23(1), 45-59. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0448-9>
- Lloyd, D. H. (1994). The preservation and maintenance of living fungi, 2nd edition, D. Smith and A. H. S. Onions. *Veterinary Dermatology*, 5(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.1994.tb00033.x>
- López-Ortega, M. D. P., Criollo-Campos, P. J., Gómez-Vargas, R. M., Camelo-Runsinque, M., Estrada-Bonilla, G., Garrido-Rubiano, M. F., & Bonilla-Buitrago, R. (2013). Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 115. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biotev.15n2.36303>

- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, *147*, artículo 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, *27*, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, *105*, 109-125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Bonilla Buitrago, R. R., & Divan Baldani, V. L. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, *15*(3), 107-120. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/13529>
- Oldroyd, G. E. D., & Leyser, O. (2020). A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science*, *368*(6.486), artículo eaba0196. <https://doi.org/10.1126/science.aba0196>
- Patel, T., & Saraf, M. (2017). Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 480-487. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1392625>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*(1), 158-161. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: Beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, *51*, 403-415. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-0996-1>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, *61*, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, *18*(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, *49*(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Sanchez López, D. B., García Hoyos, A. M., Romero Perdomo, F. A., & Bonilla Buitrago, R. R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca*

- sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 122-128. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biotev16n2.41077>
- Singh, I. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: A review. *European Journal of Biological Research*, 8(4), 191-213. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1455995>
- Sivasithamparama, K., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (eds.). (2004). *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9>
- Sundara Rao, W. V. B., & Sinha, M. K. (1963). Phosphate dissolving micro-organisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Science*, (33), 272-278.
- Vierheilig, H., & Piché, Y. (2002). Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. En B. S. Buslig, & J. A. Manthey (eds.), *Flavonoids in cell function* (serie Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 505, pp. 23-39). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5235-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5235-9_3)
- Vimal, S. R., Singh, J. S., Arora, N. K., & Singh, S. (2017). Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: A review. *Pedosphere*, 27(2), 177-192. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60309-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60309-6)
- Vitousek, P. M., Menge, D. N. L., Reed, S. C., & Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: Rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0119>
- Watanabe, F. S., & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 29(6), 677-678. <https://doi.org/10.2136/sssaj1965.03615995002900060025x>
- White, P. (2009). *Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: Reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information*. By J. K. Syers, A. E. Johnston and D. Curtin. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations (2008), pp. 108, US\$49.00. ISBN 978-92-5-105929-6. *Experimental Agriculture*, 45(1). <https://doi.org/10.1017/S0014479708007138>
- Zhang, X., Chen, B., & Ohtomo, R. (2014). Mycorrhizal effects on growth, P uptake and Cd tolerance of the host plant vary among different AM fungal species. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(2), 359-368. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.985578>



## Capítulo IV

*Beauveria bassiana*, CMICB ↑

88

### Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)

Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez  
Jennifer Lorena García Riaño\*  
Carol Viviana Amaya Gómez\*\*

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

\* Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Autora de correspondencia: Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez; correo electrónico: [luribe@agrosavia.co](mailto:luribe@agrosavia.co)

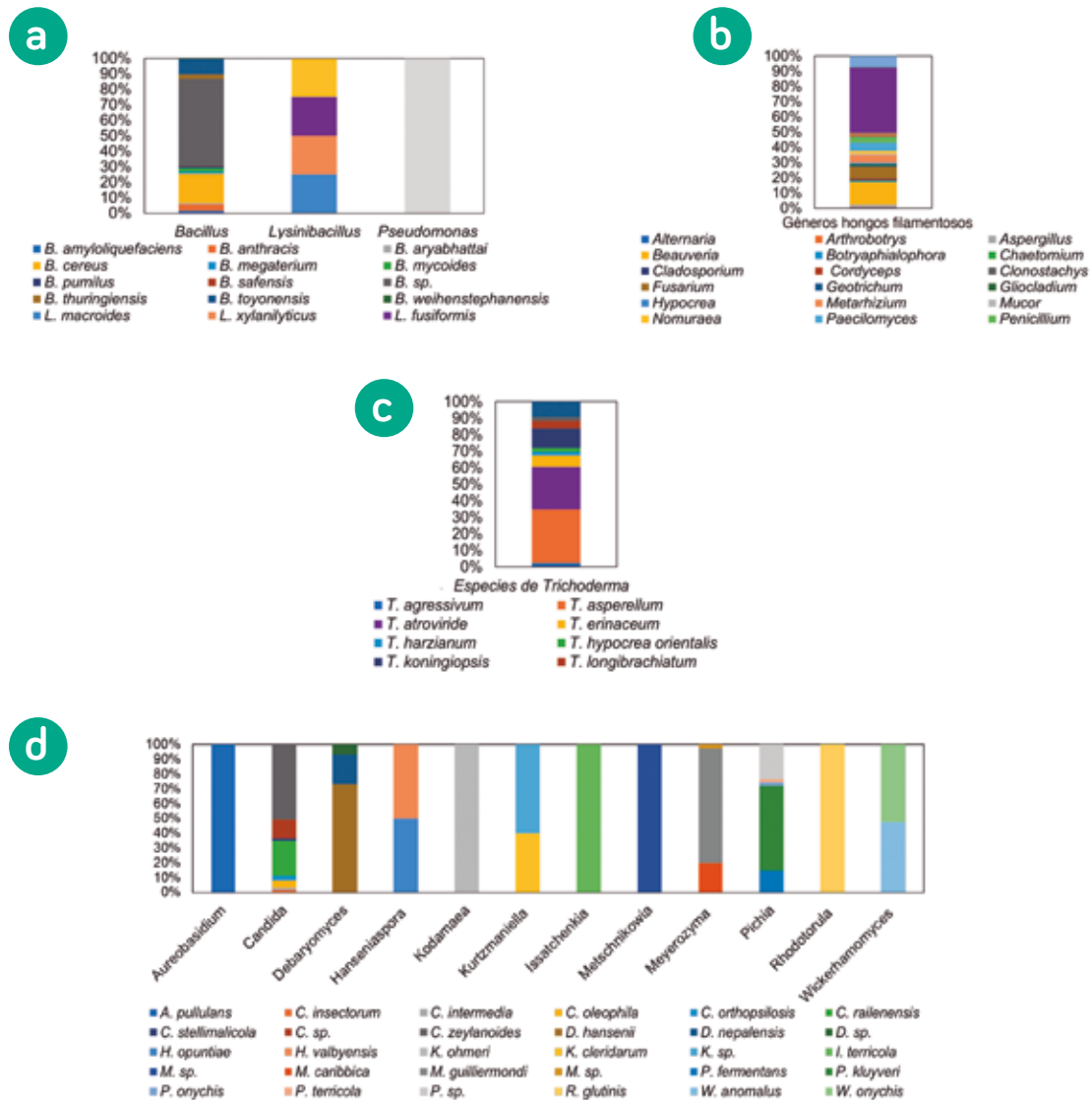
\*\* Centro de Investigación La Libertad. Villavicencio, Meta, Colombia.

Los microorganismos benéficos juegan un papel fundamental en el desarrollo de los procesos de innovación de la industria médica y agrícola. Su origen taxonómico diverso y su procedencia de diferentes hábitats les han permitido desarrollar mecanismos que pueden ser explotados en el desarrollo de procesos biotecnológicos (Yadav et al., 2017). Uno de los objetivos de los últimos años de la CMICB y de las colecciones de microorganismos en el mundo ha sido aumentar tanto la biodiversidad de los bancos como el número de sus accesiones. Por ello, se ha realizado un exhaustivo trabajo para mejorar las técnicas de aislamiento y conservación de los recursos filogenéticos presentes en diferentes hábitats (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OCDE], 2007; World Federation for Culture Collections [WFCC], 2010). La CMICB, como su nombre lo indica, tiene un interés particular en los microorganismos que ofrecen protección contra enfermedades y plagas (Bach et al., 2016; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Jaber & Alananbeh, 2018; Kumar et al., 2012; Liu et al., 2013). Una vez crecidos en medios de cultivo, la conservación y exploración de las características de dichos microorganismos permite direccionar su bioprospección y explotación industrial (Delgado-Baquerizo et al., 2016). Para garantizar la correcta preservación de sus características, es indispensable evaluar periódicamente su viabilidad, pureza y estabilidad (Calleza et al., 2017; Cruz-Cruz et al., 2013), y, de ser necesario, se debe replantear el método de conservación, ya que es de suma importancia que una colección se maneje con los más altos estándares de rigor y calidad.

La CMICB está conformada por 832 accesiones distribuidas en 3 grupos: 309 bacterias de los géneros *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Paenibacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (figura 18a); 282 hongos fitopatógenos y biocontroladores, como *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Beauveria* spp., *Fusarium* spp., *Metarhizium* spp., *Mucor* spp., *Nomuraea* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. y *Verticillium* spp., entre otros (figuras 18b y 18c), y 241 levaduras de los géneros *Aureobasidium* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Hanseniaspora* spp., *Issatchenkia* spp., *Kodamaea* spp., *Kurtzmaniella* spp., *Meyerozyma* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. y *Wickerhamomyces* spp. (figura 18d). Teniendo en cuenta el interés agrícola de esta colección, los géneros de los que el banco cuenta con mayor diversidad de especies son *Bacillus* spp. —bacterias— y *Trichoderma* spp. —hongos—, los cuales han sido reportados por varios autores como microorganismos con potencial de uso como agentes biocontroladores (Benítez et al., 2004; Fira et al., 2018; Guzmán-Guzmán et al., 2019; Liu et al., 2013; Paraszkievicz et al., 2017; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Todos los microorganismos que conforman la colección han sido aislados a partir de diversos tipos de muestras, como suelo, flósfera, rizosfera, frutos e

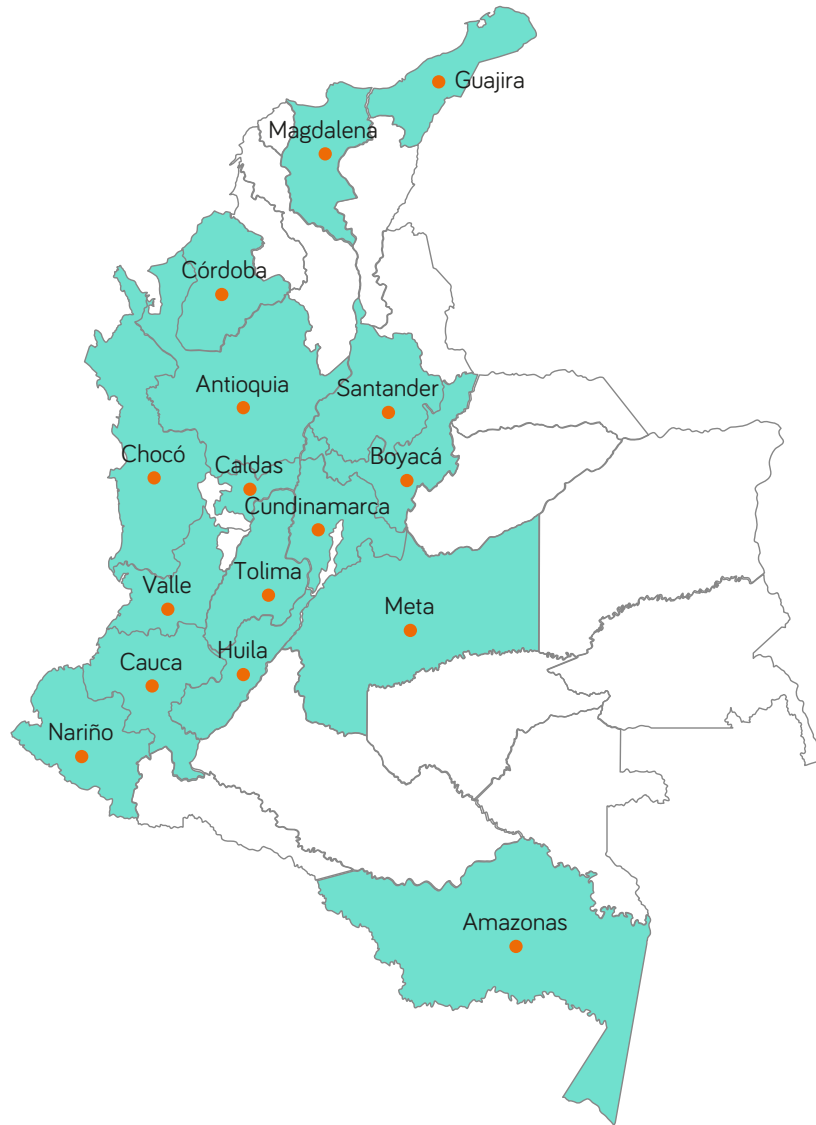
Capítulo IV. Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)



**Figura 18.** Géneros y especies de las accesiones que conforman la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB). **a.** Accesiones bacterianas; **b.** Accesiones de hongos filamentosos; **c.** Especies de *Trichoderma* spp.; **d.** Accesiones de levaduras.

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMICB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

insectos. Estas muestras, a su vez, fueron colectadas en diferentes cultivos ubicados en 17 de los 32 departamentos de Colombia (figura 19). El aislamiento de los microorganismos se realizó seleccionando muestras de plantas sanas o que presentaban síntomas o signos de enfermedades, así como de insectos infectados con hongos o bacterias entomopatógenas.



**Figura 19.** Departamentos de origen de las accesiones de la CMCB.

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMCB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

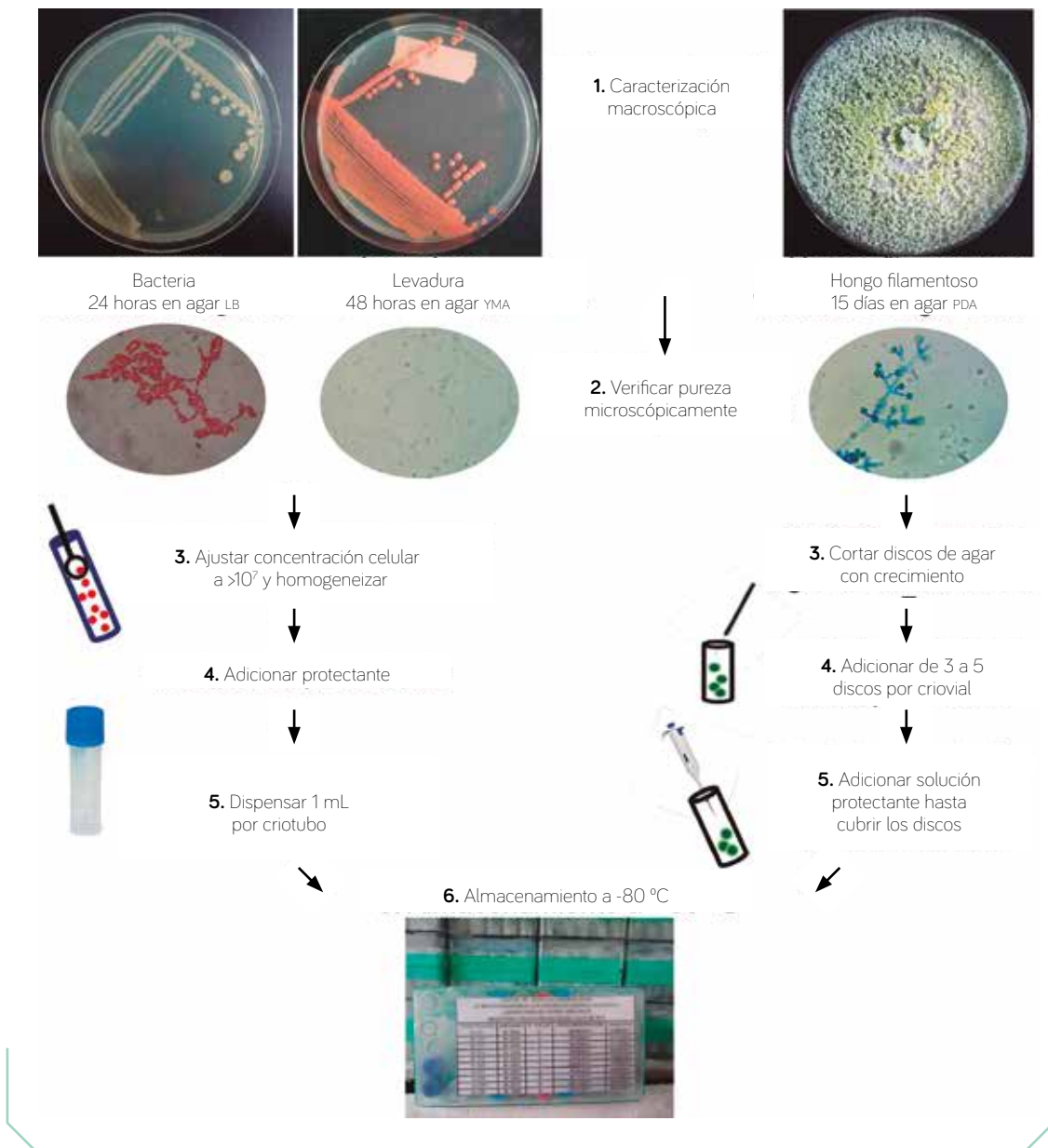
A la fecha, se puede indicar que, del total de los microorganismos que conforman la colección, el 100 % de las accesiones bacterianas se ha caracterizado morfológicamente; el 4 % y el 1 % de las accesiones de bacterias y hongos filamentosos, respectivamente, han sido caracterizados bioquímicamente, y un 6 % de las accesiones de hongos filamentosos y un 64 % de las levaduras se han caracterizado fisiológicamente. Respecto a la identificación por amplificación de regiones altamente conservadas, en cuanto al gen 16S rARN, un 43 % de las accesiones bacterianas se ha identificado, y del gen 26S rARN —las regiones ITS1 e ITS2—, un 17 % y un 98 % de las accesiones de hongos filamentosos y levaduras, respectivamente; finalmente, un 3 % de las accesiones bacterianas, un 14 % de los hongos filamentosos y un 20 % de las levaduras han sido evaluados por la acción inhibitoria de crecimiento sobre fitopatógenos o insectos plaga.

## Métodos de conservación empleados en la CMICB

Como parte de los métodos utilizados en la colección, se encuentra la conservación por congelación y liofilización, así como la metodología de recolectar, transportar y mantener la diversidad microbiana de muestras biológicas como suelo, hojas, entre otros.

### Congelación de accesiones microbianas

Los microorganismos que conforman la colección se encuentran conservados bajo el método de congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , empleando glicerol como protectante. Las bacterias son sembradas por agotamiento y por siembra masiva en agar Luria-Bertani (LB) o en agar nutritivo (composición en g/L: triptona: 10; extracto de levadura: 5; cloruro de sodio: 10, y agar: 18) y se incuban durante 24 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir del crecimiento obtenido, se verifica la pureza de la cepa, tanto macroscópica como microscópicamente, observando, con el objetivo de 100x, las células bacterianas teñidas con la coloración de Gram. Una vez se verifica la pureza, se procede a la conservación bajo el método de congelación, cuyo proceso se describe en la figura 20. A partir de la caja con crecimiento masivo, se ajusta una suspensión concentrada (superior a  $1 \times 10^7$  células/mL) en un tubo de ensayo que contiene 6 mL de solución estéril de glicerol al 10 % y peptona al 0,1 %; la suspensión se agita fuertemente hasta que esté completamente homogénea y sin grumos, con el fin de garantizar que cada una de las células quede recubierta por el crioprotectante. Ya con la suspensión celular, se adiciona 1 mL de esta en viales estériles de 2 mL de capacidad y se dejan en refrigeración durante 20 minutos, mientras el glicerol actúa con las membranas de las células (Kayingo et al., 2004). Finalmente, los viales se organizan en criocajas y se almacenan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador.



**Figura 20.** Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMICB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

Esta misma metodología es empleada para la conservación de levaduras, teniendo en cuenta que estas son sembradas en YMA (*yeast malt agar*, extracto de malta y extracto de levadura; composición en g/L: extracto de levadura: 3; extracto de malta: 3; sacarosa: 10; peptona: 5, y agar: 18) y se incuban durante 48 horas a 25 °C; en este caso también hay que verificar la pureza tanto macroscópica como microscópicamente, mediante observación de las células teñidas con azul de lactofenol, con el objetivo de 40x.

Para la conservación de hongos filamentosos, se inoculan cajas de Petri que contienen PDA (agar papa dextrosa; composición en g/L: sacarosa: 2, y agar PDA: 39), con discos de agar que evidencien crecimiento micelial o esporulación del hongo que se va a conservar. Los discos colonizados se ubican en el centro de la caja, teniendo en cuenta que el lado con crecimiento quede en contacto con el medio de cultivo. Las cajas se incuban a 25 o 28 °C durante 5-12 días, dependiendo del género microbiano. En las cajas con crecimiento se observan, en un microscopio, con el objetivo de 40x, las estructuras características de cada género teñidas con azul de lactofenol. Una vez se verifica la pureza y autenticidad de la cepa, se sacan de 3 a 5 discos de agar

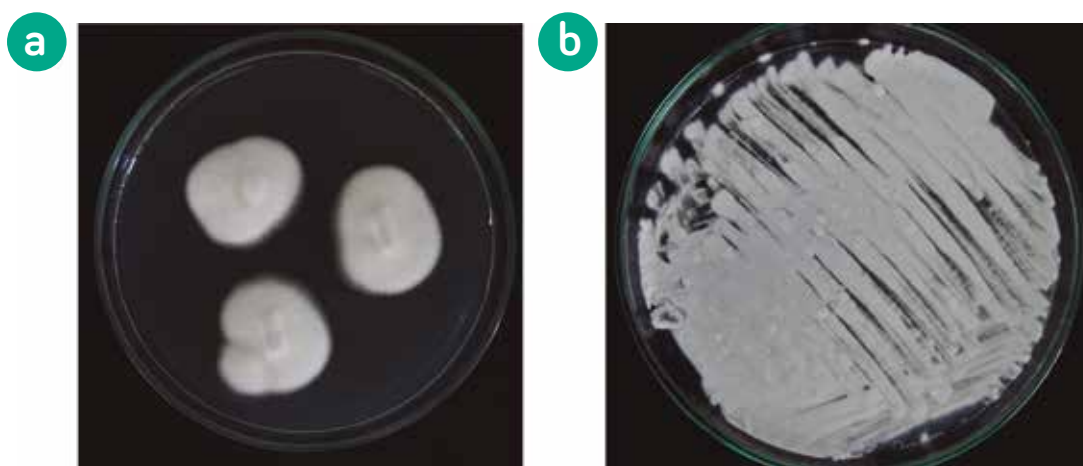
con ayuda de un sacabocados estéril (de 5 mm, aproximadamente) y se introducen, con un asa recta, en viales de 2 mL previamente esterilizados. A cada vial se le adiciona la solución protectante de glicerol (10 %) y peptona (0,1 %) hasta cubrir la totalidad de los discos (Kitamoto et al., 2002). Los viales se dejan en refrigeración durante 20 minutos, mientras el glicerol actúa con las membranas de las células, y se ubican dentro de criocajas que se almacenan a -80 °C (figura 20) (Kayningo et al., 2004).

Con el fin de obtener una mayor biomasa fúngica para la conservación, principalmente para los hongos que evidencian colonias pequeñas, como *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. y *Lecanicillium* spp., entre otros, se



↑ Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, parasitados por *T. koningiopsis*, CMCB

ajusta la concentración adicionando discos de agar en un tubo que contiene de 1 a 3 mL de polisorbato (0,1 %). A partir de dicha suspensión y como control de calidad, se toma una muestra con un asa redonda y se siembra masivamente sobre la superficie del medio a emplear, que en este caso puede ser PDA o YMA. Finalizado el periodo de incubación, se observan crecimientos como los que se muestran en la figura 21.



**Figura 21.** Crecimiento de *Lecanicillium* spp. **a.** Inoculación de discos de agar; **b.** Inoculación distribuyendo una suspensión sobre el medio de cultivo PDA.

Fotos: AGROSAVIA, Archivo CMICB. © Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

La CMICB ha garantizado la viabilidad del 96 % de los microorganismos conservados con el método de congelación, pertenecientes a diferentes géneros microbianos, por un periodo de cerca de 20 años, teniendo en cuenta que los hongos de los géneros *Metarhizium* sp. y *Rhizoctonia* sp. son los que han evidenciado una mayor pérdida de viabilidad en el tiempo en comparación con otros géneros de hongos filamentosos (Rico et al., 2005). Para este tipo de microorganismos y otros que también han evidenciado pérdida de viabilidad, se llevan a cabo procesos de investigación en los que se evalúa la conservación mediante métodos alternativos, como conservación en papel filtro a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; conservación como suspensión en solución de peptona-sacarosa en papel filtro a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; gel sílice; agua desionizada estéril; conservación de esclerocios a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y conservación en granos de arroz parbolizado, entre otros (Bahamón et al., 2001; Gaino et al., 2010; Humber, 2012; López Lastra et al., 2002; Obando Castellanos et al., 2010).



*Beauveria bassiana*, CMICB ↑

A pesar de los beneficios del glicerol como protectante, en el proceso de aprendizaje sobre las metodologías para la conservación de los microorganismos se ha encontrado que la mezcla de glicerol con peptona prolonga la viabilidad de la mayoría de los microorganismos mencionados anteriormente (figura 18). Por ello, en el protocolo de conservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se utiliza una solución de peptona ajustada al 0,1 % y de glicerol al 10 %. Es importante tener en cuenta que la concentración de glicerol debe variar según la temperatura de almacenamiento, por lo que se recomienda que, a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la concentración de glicerol sea del 50 % (Colección Española de Cultivos Tipo [CECT], 2016).

En cuanto a la edad de las células por conservar, se ha descrito que, al tomar cultivos bacterianos después de 24 horas y de levaduras después de 48, se ha logrado obtener una alta recuperación celular. Morgan et al. (2006) indican que durante la fase estacionaria se inducen diferentes estados fisiológicos que desencadenan respuestas al estrés, lo que favorece la supervivencia de las células (mayor tolerancia) y, por tanto, garantiza una mayor recuperación de células microbianas.

Para la reactivación de los diferentes microorganismos, se retira un criovial y se descongela a una temperatura promedio de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente, el trabajo se realiza a temperatura ambiente. A partir de los viales que contienen la suspensión celular, se siembra por el método de aislamiento, con un asa redonda, una muestra de la suspensión sobre el medio de cultivo agar LB o nutritivo, para bacterias, y YMA, para levaduras. Las cajas con muestra bacteriana se incuban durante 24 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y las cajas con muestras de levadura se incuban durante 48 horas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el periodo

de incubación, se realiza el proceso correspondiente de verificación de pureza observando las características macroscópicas y microscópicas típicas de cada género microbiano. Para el caso de hongos filamentosos, una vez se descongela el vial, se toma, con ayuda de un asa recta, un disco de agar y se ubica en el centro de una caja de Petri que contiene PDA. Como se mencionó anteriormente, una vez se evidencia el crecimiento del hongo, se verifica la pureza y autenticidad observando las características macroscópicas y microscópicas características del microorganismo reactivado.

## Liofilización de accesiones microbianas

Para la liofilización de los microorganismos, primero se realiza una suspensión de células (bacterias y levaduras) o conidios (hongos filamentosos) en la solución protectante seleccionada para tal fin (figura 22). Teniendo en cuenta que la CMICB se compone de diversos géneros bacterianos y de hongos, se evalúa el uso de diferentes protectantes, como la solución de leche descremada al 10 % más glutamato sódico al 1 % o una solución de glucosa al 10 % y gelatina al 1 %. Para llevar a cabo el proceso de liofilización, así como para el de congelación, se preparan las cepas que se van a liofilizar como se describe en el proceso de congelación, tomando las células, preferiblemente, del inicio de la fase estacionaria.

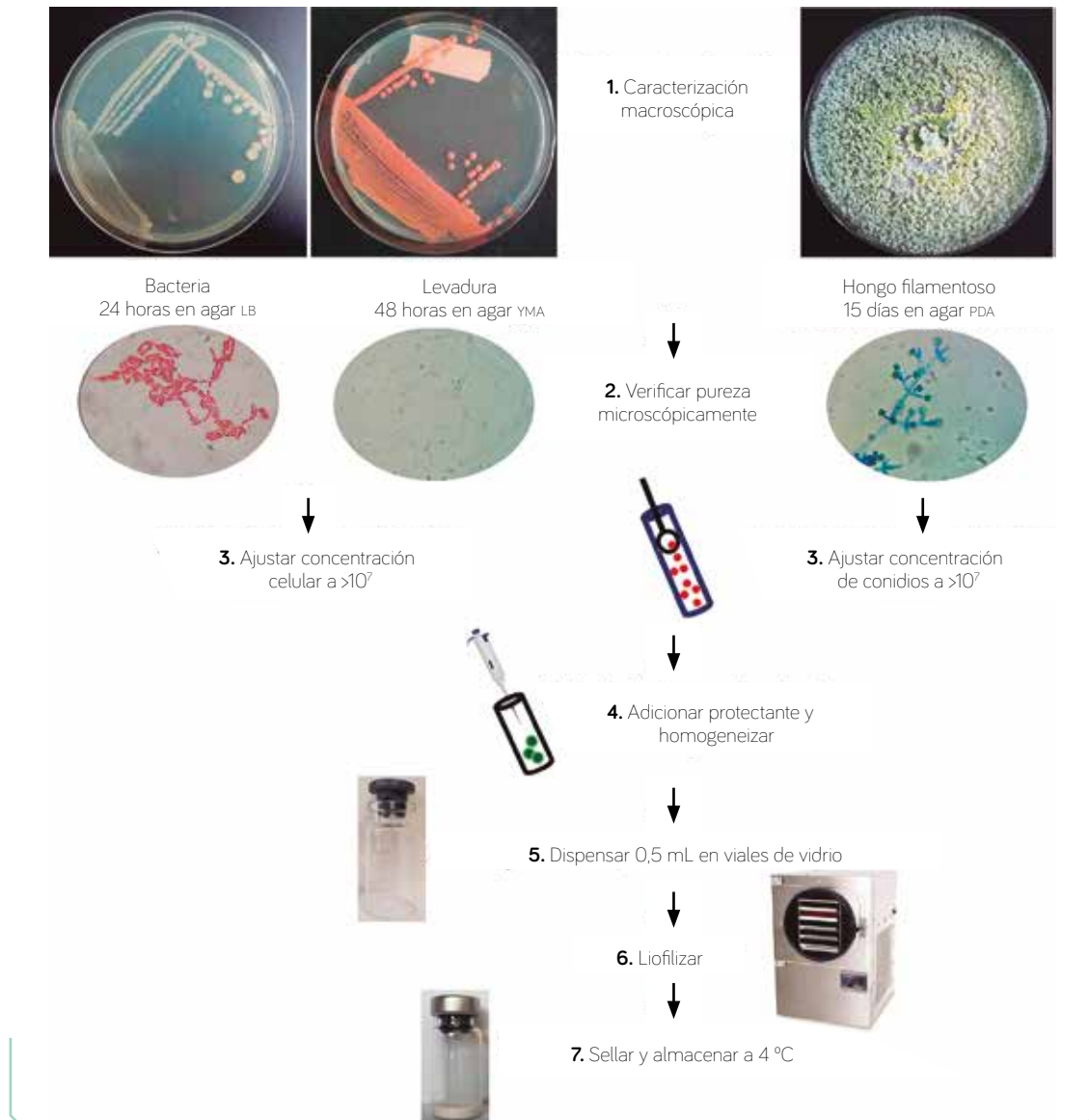
Para la conservación de los diferentes microorganismos bajo este método, se ajustan suspensiones en la solución protectante a entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células/mL, para bacterias, y a cerca de  $1 \times 10^7$ , para levaduras y hongos filamentosos. Estas concentraciones son recomendadas teniendo en cuenta el tamaño de las células y los conidios (CECT, 2016). A partir de la suspensión homogeneizada, se distribuyen 0,5 mL de la muestra en viales estériles de 10 mL de capacidad, y a cada vial se le pone un tapón de caucho tipo T, dejando un espacio disponible para que se pueda llevar a cabo el proceso de sublimación.

Las muestras son congeladas por dos horas a  $-80$  °C y posteriormente son introducidas en el liofilizador. La programación del equipo se realiza de la siguiente manera: 24 horas de secado a  $-45$  °C y con una presión de vacío no

*Aureobasidium* sp., CMICB →



superior a 1 hPa. Cada una de las bandejas del liofilizador se programa para un aumento progresivo de la temperatura: 5 horas a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, finalmente, 4 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al terminar el proceso de liofilización, se realiza el sellado de los viales al vacío empleando un compresor de 10 caballos de fuerza. Por último, los viales son retirados, sellados con un agrafe metálico y conservados en refrigeración a entre  $4\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 22.** Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de liofilización.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

La reconstitución de los liófilos se realiza con una solución salina o con un medio de cultivo alto en nutrientes en una relación 1:1 (Costa et al., 2002). Las células se dejan rehidratar por un periodo de 20 minutos, con el fin de garantizar una mayor recuperación celular (Morgan et al., 2006). Luego, sobre el medio correspondiente, se siembra la suspensión obtenida en la caja de Petri, y una vez se evidencie crecimiento microbiano, se realiza la verificación de la pureza y autenticidad de la cepa.

## Recolección, transporte y mantenimiento de muestras biológicas

Con el propósito de aislar nuevos microorganismos y ampliar la biodiversidad de la CMICB a partir de muestras de suelo y hojas, entre otras, se ha empleado el *buffer* salino (pH: 7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 44  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaCl}$ : 1,55 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 27,09  $\mu\text{M}$ ) descrito por Liao y Shollenberger (2003). De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores, este *buffer* permite la conservación a largo plazo de los microorganismos presentes en las diversas muestras recolectadas; es decir, esta metodología ofrece la posibilidad de replantear las estrategias de aislamiento, como los componentes de los medios de cultivo utilizados, y, dependiendo de los resultados obtenidos, existe la posibilidad de procesar nuevamente las muestras utilizando un enfoque diferente. Posteriormente, una vez la muestra se encuentre en el laboratorio, es necesario adicionar dimetilsulfóxido (DMSO) estéril con una concentración de entre el 0,5 y el 10 % del volumen final. Inmediatamente después de adicionar el DMSO, la muestra debe ser congelada a  $-80^\circ\text{C}$ .

Es importante resaltar que, dependiendo de los microorganismos que se desee aislar, se pueden emplear diferentes medios de cultivo. Por ejemplo, el uso de medios de cultivo mínimos permitirá el aislamiento de microorganismos oligotróficos. Otras condiciones que pueden incrementar el número de aislamientos por muestra y el aislamiento de microorganismos aún no cultivados son la sonicación de las muestras, la siembra de diluciones altas, el aumento en el tiempo de incubación, la reproducción de las condiciones ambientales del sitio de muestreo (temperatura, pH, condiciones osmóticas, superficie, etc.), el cocultivo, el tipo de agar (sólido o semisólido) y el uso de suplementos como aminoácidos y vitaminas (Kato et al., 2018; Overmann et al., 2017; Stewart, 2012).

Si el propósito del muestreo es la recolección y conservación de los ácidos nucleicos, se aconseja el uso de  $\text{N}_2$  líquido, de soluciones como la ofrecida por Qiagen, conocida como LifeGuard Soil Preservation Solution, o de *buffers* como el NAP *buffer* ( $\text{EDTA Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,019 M;  $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,018 M;  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ : 3,8 M; pH: 5,2) (Camacho-Sanchez et al., 2013).

## Autenticación de cepas

Entre las metodologías y características evaluadas para determinar la pureza y la autenticidad de las diferentes accesiones de la colección, empleamos las descritas en las tablas 1-3. Dichas metodologías se aplican según el microorganismo a evaluar (CECT, 2016; MacWilliams, 2009; Orberá Ratón, 2004; Papavizas, 1985; Pérez & Mota, 2006; Public Health England [PHE] & National Health Service [NHS], 2019; Realpe et al., 2002; Rodicio & Mendoza, 2004; Seifert, 1996; Sosa López et al., 2011; Sukarno et al., 2009; Wang & Zheng, 2012; Zare & Gams, 2008).

**Tabla 1.** Caracterización de bacterias de la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMCB)

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción de Gram	Margen de la colonia: entero, irregular y sin determinar	Asimilación o capacidad de utilizar diversos compuestos como fuente única de carbono o nitrógeno	Secuenciación de regiones del gen 16S rARN
	Forma de la colonia: circular, ondulada, lobulada, filiforme, rizoide, surcada y sin determinar	Fermentación de diferentes azúcares: glucosa, sacarosa, manitol	
	Características ópticas: opaca, translúcida, transparente, iridiscente, brillante y sin determinar	Motilidad	
	Elevación de la colonia: plana, elevada, crateriforme, puntiaguda, convexa y sin determinar	$\beta$ -hemólisis ( <i>Bacillus</i> spp.); catalasa	
	Apariencia de la colonia: aracnoide, harinosa, lisa, venosa, rugosa y sin determinar		
	Textura de la colonia: fluida, mucoide, cremosa, membranosa y sin determinar		
	Color: difusión de pigmento, coloración de Gram, producción de filamentos y esporulación		

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

**Tabla 2.** Caracterización de levaduras de la CMICB

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción azul de lactofenol	Difusión del pigmento	Asimilación o capacidad de utilizar diversos compuestos como fuente única de carbono o nitrógeno	Secuenciación de regiones del gen 26S rARN
	Color del pigmento	Fermentación de diferentes azúcares	
	Margen de la colonia: entero, irregular y sin determinar	Crecimiento en diferentes temperaturas	
	Forma de la colonia: rizoide, surcada y sin determinar	Crecimiento con diferentes pH	
	Color de la colonia	Adherencia	
	Características ópticas: opaca, translúcida, transparente, iridiscente, brillante y sin determinar	Tolerancia a radiación uv	
	Elevación de la colonia: plana, elevada, crateriforme, puntiaguda, convexa y sin determinar		
	Apariencia de la colonia: aracnoide, harinosa, lisa, venosa, rugosa y sin determinar		
	Textura de la colonia: fluida, mucoide, cremosa, membranosa y sin determinar		
	Forma de la célula		

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca



*Rhodotorula mucilaginosa* en microscopía de contraste, accesión CMICB. ↑

**Tabla 3.** Caracterización de hongos filamentosos de la CMICB

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción azul de lactófenol	Características del micelio: tipo de talo, tamaño, pared, color y formación de clamidosporas	Crecimiento en diferentes temperaturas	Secuenciación de regiones del gen ITS1 e ITS2
	Características de los conidióforos: forma, color, tamaño ( $\mu\text{m}$ ), ramificación, métula, fálide, estípide, collarete, conidiogénesis y cadenas de conidios	Crecimiento con diferentes pH	
	Presencia de ascomas y presencia de células móviles	Adherencia	
	Forma de las células	Tolerancia a radiación UV	
	Fase dicariota		
	Tipo de esporangio		
	Reproducción sexual		
	Difusión y color del pigmento		
	Margen de la colonia: regular e irregular		
	Forma de la colonia: surcada		
	Apariencia de la colonia: filamentosa, seca y húmeda		
	Textura de la colonia: lanosa, algodonosa, pulverulenta, granulosa, lisa y aterciopelada		
	Diámetro de la colonia en días		
	Temperatura de crecimiento en grados centígrados		
	Medio de crecimiento y esporulación		
	Color de la superficie de la colonia		
Color del reverso de la colonia (código)			

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

## Caracterización fisiológica

Para la CMICB es importante realizar la caracterización fisiológica de cada accesión para determinar su capacidad de crecer en diferentes rangos de temperatura, pH y actividad de agua ( $a_w$ ). Si el objetivo es seleccionar un agente con actividad biológica para el control del crecimiento de otros microorganismos, algunos de los criterios de selección son que demuestren tolerancia a factores de estrés abiótico, como radiación UV; que tengan capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas; que no sean exigentes nutricionalmente,

y que se puedan producir en medios de cultivo económicos. Las cepas élite seleccionadas, además, deben demostrar estabilidad genética (Wilson y Wisniewski, citados por Liu et al., 2013).

Actualmente, en la CMCB, se lleva a cabo la caracterización fisiológica de las levaduras, que fueron aisladas principalmente de filósfera de frutos y hojas, y son expuestas constantemente a condiciones ambientales adversas (Martirosyan & Steinberger, 2014; Mercier & Lindow, 2000; Thapa et al., 2017). Con este objetivo, los curadores de la colección seleccionan un grupo de levaduras a evaluar, teniendo en cuenta el lugar de origen y el sustrato del cual fueron aisladas. Una vez seleccionados los aislamientos, se reactivan en medio de cultivo YMA, se incuban durante 48 horas a 25 o 28 °C y, finalizado el periodo de incubación, se verifica su pureza.



*Verticillium* sp., CMCB ↑

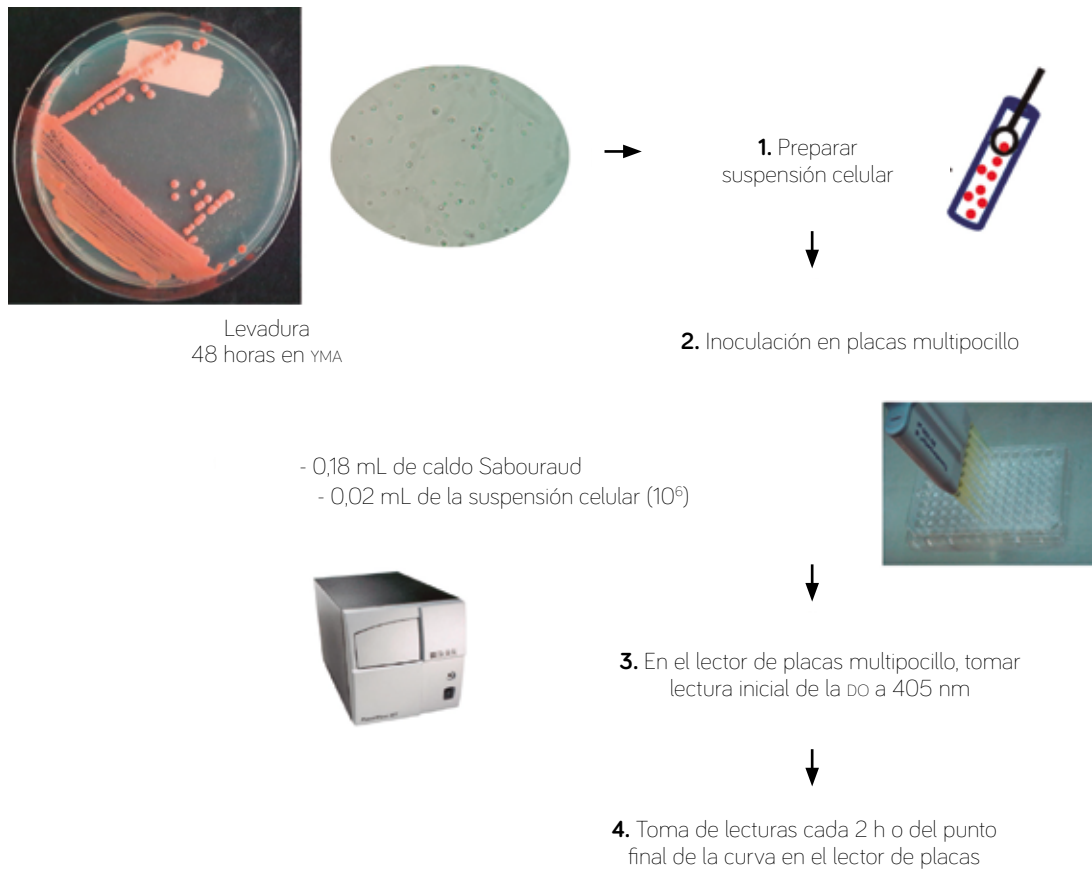
La caracterización fisiológica de levaduras se lleva a cabo en microplacas de 96 pozos (figura 23). En cada pozo se adicionan 180  $\mu$ L de medio y se inoculan con 20  $\mu$ L de cada levadura ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Una vez se realiza la inoculación, se toma la lectura de absorbancia del tiempo 0 y esto se realiza, nuevamente, después de 48 horas de incubación, empleando un lector de placas ajustado a una longitud de onda de 405 nm.

La evaluación del crecimiento a diferentes pH se realiza en el caldo Sabouraud y se ajusta a pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, con HCl y NaOH. Para la evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas, se emplea el caldo Sabouraud, y las microplacas se incuban a 4, 25, 30, 35 y 40 °C durante 48 horas. Adicionalmente, se evalúa el crecimiento en un medio de cultivo con baja disponibilidad de agua ( $a_w$ ), para lo cual se prepara el medio Sabouraud suplementado con glucosa a una concentración final del 50 % y el 60 %. Las microplacas empleadas para la evaluación a diferentes concentraciones de glucosa se incuban a 28 °C, durante 48 horas, con agitación constante a 125 rpm. Teniendo en cuenta la diferencia entre la absorbancia final (48 horas) y la inicial (tiempo 0), se determina cualitativamente el crecimiento de cada levadura como se describe en la tabla 4 (Kurtzman et al., 2010). Finalmente, todos los

**Tabla 4.** Evaluación cualitativa del crecimiento

Absorbancia obtenida	Crecimiento cualitativo
0,0 a 0,09	-
0,1 a 0,250	+
0,251 a 0,500	++
0,501 a 0,750	+++
0,751 a 1	++++

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca



**Figura 23.** Metodología para la caracterización fisiológica de levaduras.

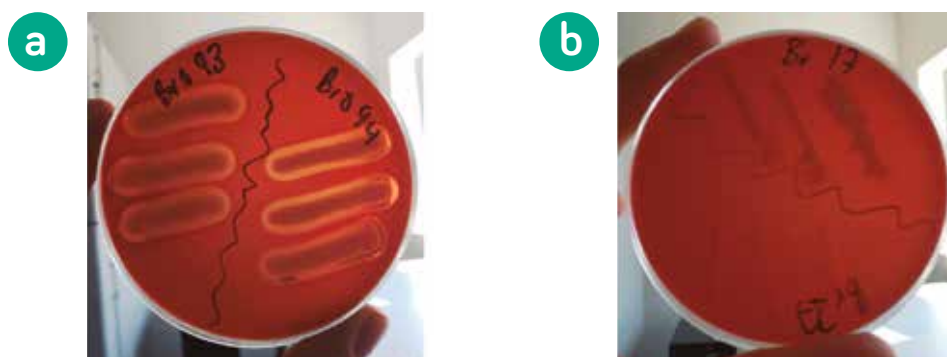
Fuente: Archivo CMCB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

datos son reportados en la base de datos del Banco de Germoplasma de Microorganismos y quedan a disposición de las personas interesadas.

La CMICB cuenta con alrededor de 300 accesiones bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* spp. Este género comprende cerca de 268 especies y 7 subespecies (PHE & NHS, 2015). Teniendo en cuenta tanto la estrecha relación entre las diferentes especies como su insuficiente divergencia en el gen 16S rARN, es necesario el uso de otras herramientas, como la evaluación de sus características bioquímicas, para su clasificación taxonómica. Esta caracterización permite identificar y seleccionar aquellas especies que no causen infecciones en humanos y puedan ser empleadas en procesos de bioprospección, con el fin de determinar su potencial uso para el control de patógenos como, por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* y *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*, entre otros (Kong et al., 2010; Neher et al., 2009; Yang & Sung, 2011), así como para la producción y obtención de compuestos antimicrobiales con diferentes estructuras, la producción de agentes surfactantes y probióticos, entre otros usos (Fira et al., 2018; Paraszkievicz et al., 2017).

### Prueba de hemólisis

Diferentes especies del género *Bacillus* spp. tienen la habilidad de inducir hemólisis cuando crecen en el medio de cultivo agar sangre (tabla 5) (PHE & NHS, 2019; Realpe et al., 2002). Con el fin de elucidar, entre las diferentes cepas bacterianas, cuáles tienen la capacidad de producir hemólisis, se realiza el siguiente procedimiento: a partir de un cultivo de 24 horas en el medio de cultivo agar LB, se toma una muestra de la bacteria con ayuda de un asa estéril y se inocula una estría sobre el medio de cultivo. Las cajas se incuban a 30 °C durante 48 horas y posteriormente se observan las características de



**Figura 24.** Prueba de hemólisis. **a.** Resultado positivo; **b.** Resultado negativo para diferentes accesiones del género *Bacillus* de la CMICB.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

**Tabla 5.** Especies del género *Bacillus* con capacidad hemolítica

Microorganismo/grupo	Resultado
<i>B. anthracis</i>	No hemolítico (ocasionalmente puede producir una hemólisis débil)
Especies incluidas dentro del grupo de <i>B. cereus</i> ( <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycooides</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. weihenstephanensis</i> )	β-hemolíticos
Especies incluidas dentro del grupo de <i>B. subtilis</i>	β-hemolíticos

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, con base en PHE y NHS (2019)

la colonia para determinar si corresponden a cepas no hemolíticas, β-hemolíticas o α-hemolíticas. Los ensayos se deben realizar por triplicado y deben contar con un control positivo y negativo (figura 24) (Realpe et al., 2002).

### Catalasa

La producción de peróxido se debe a la presencia de las peroxidasa. Estas enzimas son de interés por su potencial redox y su capacidad de oxidar compuestos resistentes a la degradación. En consecuencia, la evaluación de esta característica en diferentes microorganismos ha aumentado por su posible aplicación y uso en varios sectores de la industria (Falade et al., 2019). Entre las pocas especies de *Bacillus* reportadas por la producción de peroxidasa, se encuentran *B. megaterium* (Patil, 2014) y *B. subtilis* (Rao & Kavya, 2014), dado que esta capacidad se le atribuye principalmente a las actinobacterias (Falade et al., 2019).

La metodología que se utiliza para realizar esta prueba es la descrita por The American Society for Microbiology (ASM), en la que, a partir de una caja con entre 18 y 24 horas de incubación, se toma una colonia pura con ayuda de un asa estéril y se extiende sobre una lámina portaobjetos teniendo cuidado de no llevar pedazos de agar. Empleando una pipeta de Pasteur, se adiciona sobre la muestra una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3 %. La muestra con peróxido no se mezcla, y, una vez se adicione, se debe observar la formación de burbujas, que indica reacción positiva para catalasa. Como control positivo, se sugiere emplear una cepa de *Staphylococcus aureus* (López-Prieto et al., 2019).

## Actividad biológica

La CMICB tiene un interés particular en la búsqueda de microorganismos que demuestren un potencial biotecnológico para el sector agropecuario, especialmente en aquellos que tengan capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos y plagas de interés agrícola.

La exploración de las características y los atributos biológicos de las cepas que conforman la colección se realiza para nutrir la base de datos, que sirve de insumo para procesos de bioprospección. Por ello, es indispensable llevar a cabo no solo la evaluación de la caracterización fisiológica, sino también el estudio de la actividad antimicrobiana o antagónica, para determinar, así, los efectos benéficos o adversos de un microorganismo sobre un organismo objetivo. El grupo de investigación de Control Biológico de Plagas Agrícolas de AGROSAVIA, que inició la CMICB, ha desarrollado, estandarizado y validado metodologías que permiten evaluar la actividad antagónica de diferentes géneros microbianos con interés biotecnológico, con el fin de seleccionar aquellos que evidencien un potencial de uso para el desarrollo de bioinsumos de uso agrícola.

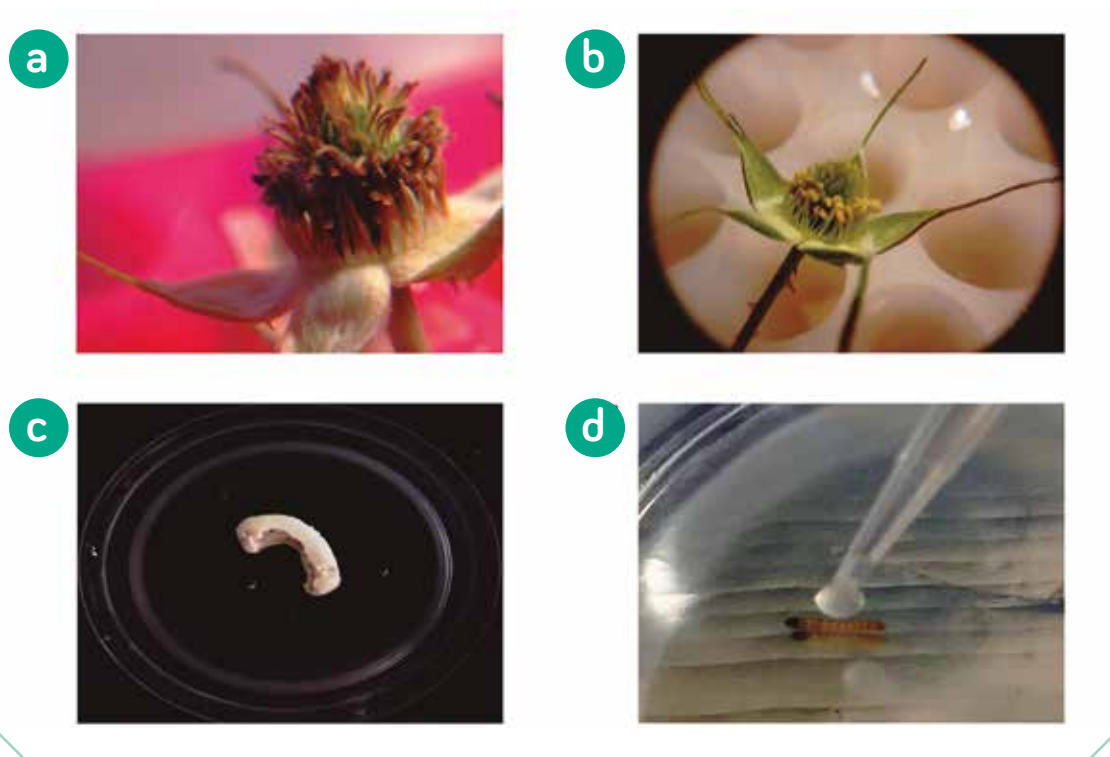
Teniendo en cuenta que la CMICB ha aislado y actualmente conserva varias cepas de hongos entomopatógenos, a continuación se describe la ruta que varios investigadores han seguido para realizar el estudio de la actividad insecticida de hongos como *Metarhizium* spp., *Nomuraea* spp. y *Paecilomyces* spp., entre otros. En primer lugar, se desarrollan metodologías que permiten determinar las condiciones nutricionales o fisicoquímicas requeridas por el microorganismo para su óptimo crecimiento y, por tanto, alcanzar una alta producción masiva de conidios o estructuras de infección (Aguirre et al., 2009; Cruz Barrera et al., 2019). Simultáneamente, se determina la concentración, frecuencia y método de inoculación efectiva del agente de control biológico sobre los insectos objetivo. A modo de ejemplo, para el caso de larvas de plagas como

*Bacillus* sp., CMICB →



*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), entre otras, se han seleccionado métodos de inoculación como, por ejemplo, la infección tópica o la sumersión de las larvas en una suspensión conocida de conidios del hongo entomopatógeno evaluado (figura 23).

Para determinar la actividad biocontroladora de microorganismos sobre hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum*, se han descrito metodologías que permiten determinar el tipo de efecto antagónico, directo o indirecto, así como el modo de acción: parasitismo, inhibición o competencia (figura 25).



**Figura 25.** Patisistemas empleados para la evaluación de la actividad biológica de *Rhodotorula mucilaginosa* para el control de *Botrytis cinerea* en flor. **a.** Flor con signos de *B. cinerea* (control); **b.** Flor inoculada con *R. mucilaginosa* y el patógeno (inoculación de larvas *Diatraea saccharalis* con *Beauveria bassiana*); **c.** Larva infectada; **d.** Inoculación tópica por gota.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

A continuación, en la tabla 6, se listan las referencias que detallan las metodologías que se han desarrollado para evaluar la actividad antagonista de accesiones que conforman la CMICB.

**Tabla 6.** Referencias para metodologías de autenticación de cepas de la CMICB.

Referencia	Microorganismos/organismos	Actividad biológica
Beltrán Acosta et al. (2012)	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003, <i>Trichoderma asperellum</i> Th034 y <i>Solanum tuberosum</i>	Control biológico y promoción de crecimiento
Bosa y Cotes (1997)	<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	Control biológico
Bosa O. et al. (2004)	<i>Nomuraea rileyi</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	Control biológico
Cotes et al. (2011)	Levaduras filamentosas y <i>Botrytis cinerea</i>	Control biológico
Espinel et al. (1998)	<i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> (Orthoptera: Acrididae)	Control biológico
García et al. (2018)	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. y <i>Diatraea</i> sp.	Control biológico
González-García (1997)	<i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viegas (Deuteromycete: Moniliales) y <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae)	Control biológico
Ochoa y Cotes (1998)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> y <i>Trichoderma hamatum</i>	Control biológico
Pérez et al. (1997)	<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Tecia solanivora</i> (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)	Control biológico y actividad insecticida
Raymond C. et al. (2004)	Hongos entomopatógenos: <i>Metarhizium anisopliae</i> (Mt019 y Mt020), y garrapata: <i>Boophilus microplus</i>	Control biológico
Rubio C. et al. (2004)	<i>Trichogramma lopezandinensis</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	Control biológico
Torres y López (1997)	<i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae), <i>Beauveria</i> sp. y <i>Metarhizium</i> sp.	Control biológico
Torres-Torres y Cotes (1999)	Hongos entomopatógenos y <i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Control biológico

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

## Caracterización de fenotipos microbianos

Para la determinación de los fenotipos de la colección se han establecido las metodologías de placas multipozo y la utilización de varios medios de cultivo, los cuales se describen a continuación.

### Placas multipozo

El empleo de placas multipozo permite la caracterización de numerosos fenotipos en bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Entre las ventajas y desventajas de este método, se encuentran las siguientes (Corral-Lugo et al., 2012):

#### Ventajas:

- Evaluación rápida del crecimiento microbiano bajo diferentes condiciones nutricionales y abióticas, como diferentes medios de cultivo o diferentes temperaturas de crecimiento.
- Estudio de la producción de metabolitos, como sideróforos o antimicrobianos.
- Evaluación de fenotipos microbianos, como la formación de biopelículas.
- Evaluación simultánea de varias accesiones en la misma placa.
- Alta reproducibilidad de los datos.
- Obtención rápida de resultados.

#### Desventajas:

- La densidad óptica no está únicamente relacionada con el crecimiento microbiano.
- Menor crecimiento microbiano ocasionado por una menor ratio entre el volumen del medio de cultivo líquido y el de oxígeno.
- El poliestireno no es necesariamente la superficie usada por bacterias en condiciones naturales para formar biopelículas.

### Medios de cultivo para diferenciación de fenotipos

Al igual que para el aislamiento de los distintos microorganismos, el medio de cultivo y las características ambientales que se proporciona para su crecimiento son cruciales para lograr que un fenotipo sea expresado en condiciones de laboratorio. Factores como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y su

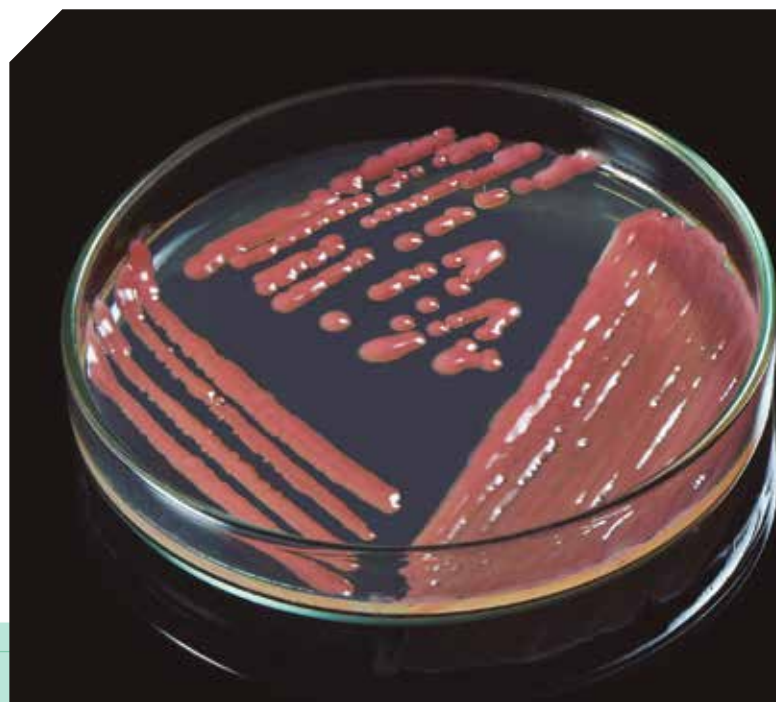
concentración en el medio de cultivo permitirán la visualización o no del fenotipo microbiano de interés. En un estudio reciente en el que se evaluó la capacidad de tres cepas de *Rhizobium* sp. de solubilizar roca fosfórica, se observó que el cambio de extracto de levadura (0,5 g/L) por  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (0,5 g/L) fue suficiente para evidenciar un incremento de entre el 40 y el 60 % en la capacidad de estos microorganismos de solubilizar fosfato (Amaya-Gómez et al., 2020). Adicionalmente, se evidenció que la sustitución del manitol por fructuosa como fuente de carbono llevó a una reducción en esta actividad microbiana.

Ya que el carbono es uno de los nutrientes más relevantes para la caracterización fisiológica de las accesiones, la CMICB profundiza en su diversidad metabólica haciendo uso de placas multipozo. Con estas placas es posible evidenciar rápidamente la capacidad de cada microorganismo de usar diferentes fuentes de carbono, y con esta información se procede a caracterizar diferentes fenotipos, teniendo en cuenta la diversidad metabólica de cada accesión.

Debido a que la motilidad microbiana es uno de los fenotipos de competencia que les permite a las bacterias colonizar huéspedes eucariotas, la evaluación de este fenotipo también se encuentra entre las caracterizaciones fisiológicas que se realizan para la caracterización de los microorganismos que hacen parte la colección. En primer lugar, se evalúa la motilidad tipo *swimming* (Kearns, 2010) en el medio Bromfield preparado con una concentración de agar del 0,3 %; en este, la alta cantidad de agua presente permite que las bacterias motiles se desplacen dentro de los poros de agar. Dado que este tipo de motilidad es dependiente de flagelos, este ensayo permite evidenciar de manera indirecta la presencia de estos organelos en las accesiones, aunque esto debe ser corroborado por tinción y microscopía.

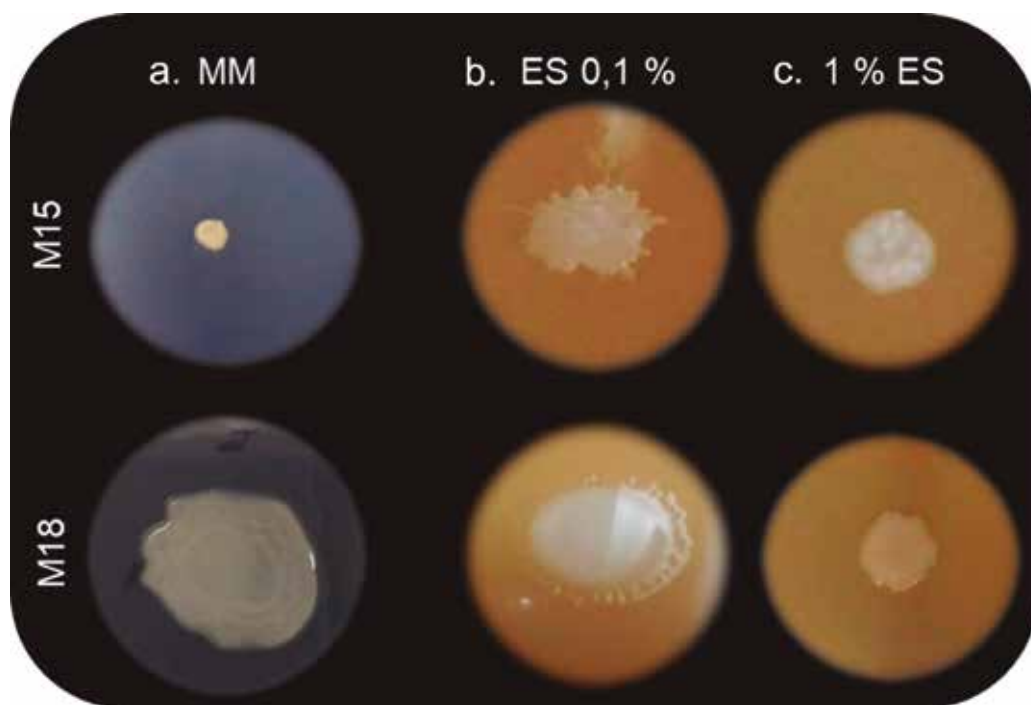
El otro tipo de motilidad que se caracteriza es la motilidad en superficie. De acuerdo con Kearns (2010), las bacterias pueden moverse sobre superficies empleando motilidad tipo *swarming*, *twitching*, *sliding* o *gliding*. El tipo de motilidad empleado depende de si el movimiento entre la población del organelo utilizado como motor de movimiento

*Rhodotorula mucilaginosa*, CMICB →



y las señales ambientales detectadas es coordinado o no. En concordancia con este último factor, es necesaria la evaluación de este fenotipo bajo distintas condiciones nutricionales y abióticas.

En la figura 26 se puede observar un ejemplo de motilidad en superficie de dos cepas de *Burkholderia* sp., la M15 y la M18, con capacidad de solubilizar fósforo. Si bien M15 fue incapaz de moverse en medio mínimo (MM) (Robertsen et al., 1981) con una concentración de agar del 0,6 %, al adicionar extracto de suelo al 0,1 % y al 1 % (MM + ES) a este medio, se observó la expansión de la colonia. En el caso de M18, se puede observar que esta cepa presentó este fenotipo bajo todas las condiciones evaluadas. En ambos casos se puede observar que la forma de la colonia es diferente bajo cada condición de estudio, lo que puede deberse a los tipos de motilidad en superficie que se están evidenciado en cada medio de cultivo. Si el propósito fuera comprobar qué tipo de motilidad en superficie se presenta en cada caso, sería necesaria la caracterización de este fenotipo en mutantes de cada cepa u otros determinantes implicados en cada tipo de motilidad (Amaya-Gómez et al., 2020).



**Figura 26.** Motilidad de *Burkholderia* sp. M15 y M18 en superficie. **a.** Medio mínimo (MM) (Robertsen et al., 1981); **b.** MM suplementado con 0,1 % de extracto de suelo; **c.** MM suplementado con 1 % de extracto de suelo.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI La Libertad, Villavicencio, Meta

Para identificar los nutrientes requeridos para la inducción de un fenotipo microbiano, se puede emplear el método descrito por Rajeswari et al. (2015). Con el diseño estadístico Plackett-Burman es posible identificar los nutrientes y la concentración requerida para la inducción de un fenotipo microbiano. En su estudio se describe el uso de este método para inducir la producción de un antimicrobiano en una cepa de *Streptomyces* sp. Al igual que las condiciones nutricionales del medio de cultivo, los factores ambientales, como el pH del cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, entre otros, son esenciales para la manifestación de los fenotipos bajo estudio. El diseño Plackett-Burman puede ser también empleado para la identificación de los factores abióticos más relevantes.

## Caracterización bioquímica de bacterias

Para la caracterización del recurso biológico con que cuenta la colección, se realiza la evaluación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos que la conforman. La determinación de estas características permite identificar el potencial que tiene cada accesión, y los resultados obtenidos brindan información base para el diseño apropiado de procesos de producción, formulación y obtención de la molécula de interés y para continuar con proyectos de investigación más específicos (Fira et al., 2018).

Por otra parte, en el caso de la identificación de las diferentes especies del género *Bacillus* spp., es necesario llevar a cabo la elaboración de pruebas bioquímicas que permitan determinar si un aislamiento corresponde a determinada especie o no. Esta actividad es de suma importancia, dado que el género *Bacillus* spp. comprende más de 268 especies y 7 subespecies con características morfológicas y moleculares muy similares, que pueden llevar a una clasificación incorrecta (tabla 7) (PHE & NHS, 2019). También se aconseja realizar pruebas de asimilación o de fermentación de determinados sustratos (fuentes de carbono y nitrógeno) y determinar tanto las características de las colonias en diferentes medios de cultivo como el crecimiento bajo condiciones aerobias o anaerobias y en diferentes temperaturas y concentraciones de sal (Alippi, 2019).

## Actividad de proteasa

Las proteasas son uno de los grupos más importantes de enzimas comerciales e industriales que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas

**Tabla 7.** Clasificación taxonómica de especies del género *Bacillus* spp. según las características fisicoquímicas evaluadas

Especie	Lecitinasa	Motilidad	Sensibilidad a la penicilina	Formación de cristal
<i>B. anthracis</i>	+*	-	S <sup>**</sup>	-
<i>B. cereus</i>	+	+	R	-
<i>B. megaterium</i>	-	+	R	-
<i>B. mycoides</i>	+	-	R	-
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	R	+
<i>B. circulans</i>	-	+	R	-
<i>B. coagulans</i>	-	+	R	-
<i>B. licheniformis</i>	-	+	R	-
<i>B. pumilus</i>	-	+	R	-
<i>B. subtilis</i>	-	+	R	-
<i>B. sphaericus</i>	-	+	R	-

\* *B. anthracis* puede producir zonas delgadas alrededor de la colonia, por lo que se recomienda reconfirmar la reacción.

\*\* S: sensible; R: resistente.

Fuente: PHE & NHS (2019)

*Trichoderma koningiopsis*, CMICB ↓



y péptidos (Bach et al., 2012). Los microorganismos representan una excelente fuente de estas enzimas, debido a las ventajas económicas en la producción, la diversidad bioquímica y la posibilidad de manipulación genética (Aguilar & Sato, 2018). Para la evaluación de esta característica, empleamos la metodología descrita a continuación: se emplea agar *skim milk* (1 %) con 0,5 g/L de NaCl y un pH de 7 (Hernández Guzmán, 2014). A partir de cultivos con 24 horas en agar LB, se inocula una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/mL en 50 mL de caldo LB (relación de 1:5). Los erlenmeyer se incuban a 30 °C durante 60 horas a 130 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, el medio se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos con el fin de precipitar las células vegetativas. Del sobrenadante libre de células se toman 5 mL y se pasan a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. A partir del extracto libre de células, se inoculan 3 gotas de 20  $\mu$ L sobre discos de papel filtro ubicados sobre el medio *skim milk*. Como testigo relativo, se emplea el caldo fermentado con células, y como testigo negativo, el papel filtro inoculado con agua destilada estéril. Las cajas se incuban a 30 °C durante 24 horas y se mide el halo de inhibición evidenciado alrededor de la colonia debido a la degradación del medio *skim milk* por acción de las proteasas presentes en la muestra.

### Actividad de lecitinasa

Esta característica se evalúa porque permite identificar las cepas de *Bacillus* spp. que son potencialmente patógenas (Sharaf et al., 2014). De cajas con 24 horas en medio LB, y con ayuda de un asa estéril, se toma biomasa celular y se inocula por estría sobre el medio agar nutritivo suplementado con emulsión de yema de huevo (8 %); las cajas se incuban a 30 °C durante 48 horas. La prueba se considera positiva por la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo (Bhat et al., 2013).

115

### Test de indol

La evaluación de esta característica es importante, ya que el indol es una molécula de señalización intracelular en bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Esta molécula controla diversos procesos, como la comunicación celular (*quorum-sensing*), la formación de esporas, la resistencia a drogas, la formación de *biofilm* y la virulencia, entre otros (Smith et al., 2014). Su evaluación ha sido reportada para la identificación de especies de *Bacillus* spp., junto con las pruebas de reacción catalasa, reducción de nitrato y ureasa, entre otras (Alippi, 2019).

Para determinar la capacidad de las bacterias para producir indol a partir de la hidrólisis del aminoácido triptófano por la enzima triptofanasa, se emplea la siguiente metodología (Public Health Wales et al., 2010): cada una de las accesiones se reactivan en el medio agar LB por agotamiento, y las cajas se incuban durante 24 horas a 28 °C. Finalizado el periodo de incubación, se toma una colonia del bacilo crecido sobre el medio de cultivo con ayuda de un asa recta y se siembra por punción en el medio de cultivo SIM (*sulfide indole motility*). Se debe contar con un control, que corresponde a un tubo con el medio sin inocular y tres réplicas por microorganismo (tres tubos). Los tubos que contienen el medio SIM inoculado se incuban a 28 °C por 48 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación, se adiciona una gota del reactivo de Kovac al tubo inoculado y al tubo control, con el fin de observar un cambio de color del medio inoculado con el bacilo con respecto al tubo control.

## Identificación molecular

La identificación molecular de las accesiones bacterianas se realiza mediante la secuenciación del gen 16S rARN, empleando los *primers* universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTAC-GACTT-3') (Alippi, 2019). La identificación de levaduras se realiza mediante la amplificación correspondiente al dominio D1/D2 de la subunidad mayor (LSU) del rARN (26S rARN), con los *primers* NL1F (5'-GCATATCAATAAGCG-GAGGAAAAG-3') y LR6R (5'-GGTAAGCAGAACTGGCG-3') (Orberá Ratón, 2004). Para la identificación de hongos filamentosos, se realiza la amplificación de un fragmento de los genes que codifican para la región intergénica (ITS), el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) y el de ergosterol (ERG-1). Los *primers* empleados son: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'), EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'), EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'), RG1F (5'-CGCTCCGT-GCTTCTTCTCTC-3') y ERG1R (5'-CTTCTTCTCTCCCGTCTCC-3') (Samuels et al., 2006).

## Referencias

- Aguilar, J. G. dos S., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Aguirre, N., Villamizar R., L., Espinel C., C., & Cotes P., A. M. (2009). Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 138-144. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882009000200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882009000200005)
- Alippi, A. M. (2019). Data associated with the characterization and presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples by using HiCrome *Bacillus* agar. *Data in Brief*, 25, artículo 104206. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104206>
- Amaya-Gómez, C. V., Porcel, M., Mesa-Garriga, L., & Gómez-Álvarez, M. I. (2020). A framework for the selection of plant growth-promoting rhizobacteria based on bacterial competence mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, artículo e00760-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00760-20>
- Bach, E., Sant'Anna, V., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., & Brandelli, A. (2012). Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochemistry*, 47(12), 2.455-2.462. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.007>
- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Pereira Passaglia, L. M. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Bahamón, T., Aycardi, E., Orozco, J., Marín, P., & Bustilo, A. (2001). Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) *Vuillemin* (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(1), 80-90. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30066>
- Beltrán Acosta, C., Moreno, C. A., Blanco, P., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2012). Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). *IOBC-WPRS*, 78, 223-227. [https://www.iobc-wprs.org/members/shop\\_en.cfm?mod\\_Shop\\_detail\\_produkte=33#toggle71](https://www.iobc-wprs.org/members/shop_en.cfm?mod_Shop_detail_produkte=33#toggle71)
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15666245/>
- Bhat, A. R., Irorere, V. U., Bartlett, T., Hill, D., Kedia, G., Morris, M. R., Charalampopoulos, D., & Radecka, I. (2013). *Bacillus subtilis* natto: A non-toxic source of poly- $\gamma$ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria. *AMB Express*, 3, artículo 36. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-36>

- Bosa, C. F., & Cotes, A. M. (1997). Evaluación de la actividad insecticida de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Revista Colombiana de Entomología*, 23(3-4), 107-112.
- Bosa O., C. F., Chávez, D., Torres, L., París, A., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2004). Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 93-97. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882004000100014](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100014)
- Caleza, V., Castillo, S., Gomis, M. D., Kamah, S., López, R., Garcia-Seco, D., Varma, A., & Akdi, K. (2017). Conservation strategies of new fungi samples in culture collections: *Piriformospora indica* case. En A. Varma, & A. Kumar Sharma (eds.), *Modern tools and techniques to understand microbes* (pp. 431-447). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4>
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663-673. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12108>
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (2016). *Memorias: III Certificado de Especialización en Conservación y Control de Cepas Microbianas* [manuscrito inédito].
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401016>
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., & Viñas, I. (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 873-878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x>
- Cotes, A. M., Zapata, J., Díaz, A., García, M., Medina, C., Cristancho, D., Rodríguez, S., Rodríguez, F., & Uribe, D. (2011). Selección de levaduras filoféricas con potencial para el control biológico de *Botrytis cinerea*. *Fitopatología Colombiana*, 35(2), 51-56. <https://agripfiles.agri-d.net/display/AS-pub-DC23497F01B5DF9912776B163406DE05>
- Cruz Barrera, M., Gómez, M. I., & Serrato Bermúdez, J. C. (2019). Towards the production of fungal biocontrol candidates using inert supports: A case of study of *Trichoderma asperellum* in a pilot fixed bed fermenter. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 162-184. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1542486>
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arno, M. T., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2(2), 73-95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7, artículo 10541. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>

- El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1), 25-35. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>
- Espinel, C., Ebratt, E., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistosceroides* (Orthoptera: Acrididae). *Revista Colombiana de Entomología*, 24(1-2), 1-5.
- Falade, A. O., Mabinya, L. V., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019). Studies on peroxidase production and detection of *Sporotrichum thermophile*-like catalase-peroxidase gene in a *Bacillus* species isolated from Hogsback forest reserve, South Africa. *Heliyon*, 5(12), artículo e03012. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03012>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Gaino, A. P. da S. de C., Basseto, M. A., Gasparotto, L., Poltronieri, L. S., & Ceresini, P. C. (2010). Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3), 385-395. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.4856>
- García, J. L., Sotelo, P., Monroy, D. M., Barrera, G., Gómez-Valderrama, J., Espinel, C., Barreto, E., & Villamizar, L. F. (2018). Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *Biología Aplicada*, 35(1), 1.201-1.207. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2018/ba181a.pdf>
- González-García, J. (1997). Evaluación de cepas nativas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas (Deuteromycete: Moniliales) en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1-2), 25-30.
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: Versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109(1). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Hernández Guzmán, C. (2014). *Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en Bacillus thuringiensis* [tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (Cicese)]. Cicese Repositorio. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/622>
- Humber, R. A. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En L. A. Lacey (ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (2.ª ed., pp. 317-328). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00010-5>
- Jaber, L. R., & Alananbeh, K. M. (2018). Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.007>

- Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S., Kawasaki, K., Tamaki, H., Kitagawa, W., Abe, A., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K., & Kamagata, Y. (2018). Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), artículo e00807-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00807-18>
- Kayingo, G., Sirotkin, V., Hohmann, S., & Prior, B. A. (2004). Accumulation and release of the osmolyte glycerol is independent of the putative MIP channel Spac977.17p in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(2), 85-92. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020273.64829.9a>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 634-644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S., & Yamanaka, K. (2002). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43(2), 143-149. <https://doi.org/10.1007/S102670200021>
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., & Yu, F. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 31-35 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.036>
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (eds.). (2010). *The yeast: A taxonomic study* (5.<sup>a</sup> ed). Elsevier Science & Technology. <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts#book-info>
- Liao, C.-H., & Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 45-50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- López Lastra, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80(10), 1126-1130. <https://doi.org/10.1139/b02-090>
- López-Prieto, A., Martínez-Padrón, H., Rodríguez-López, L., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 509-516. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1607909>
- MacWilliams, M. P. (2009). *Indole test protocol*. American Society for Microbiology. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3202>

- Martirosyan, V., & Steinberger, Y. (2014). Microbial functional diversity in the phyllosphere and lamosphere of different desert plants. *Journal of Arid Environments*, 107, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.04.002>
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 369-374. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.369-374.2000>
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Neher, O. T., Johnston, M. R., Zidack, N. K., & Jacobsen, B. J. (2009). Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control*, 48(2), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.012>
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Bonilla Buitrago, R. R., & Divan Baldani, V. L. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107-120. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/13529>
- Ochoa, J., & Cotes, A. (1998). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* mediante su uso individual y/o combinada para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines*, 22(1-2), 88-93.
- Orberá Ratón, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15-19. <http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2007). OECD best practice guidelines for biological resource centres. <http://www.oecd.org/sti/emerging-tech/oecdbestpractice-guidelinesforbiologicalresourcecentres.htm>
- Overmann, J., Abt, B., & Sikorski, J. (2017). Present and future of culturing bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 711-730. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093449>
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 23-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
- Paraszkiewicz, K., Bernat, P., Siewiera, P., Moryl, M., Paszt, L. S., Trzciński, P., Jałowiecki, Ł., & Płaza, G. (2017). Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production. *Scientia Horticulturae*, 225, 802-809. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.034>
- Patil, S. R. (2014). Production and purification of lignin peroxidase from *Bacillus megaterium* and its application in bioremediation. *CIBTech Journal of Microbiology*, 3(1), 22-28. <https://www.cibtech>.

org/J-Microbiology/PUBLICATIONS/2014/Vol-3-No-1/CJM-06-006-SARVAMANGALA-PRODUCTION-BIOREMEDIATION.pdf

Pérez, O., Rodríguez, A., & Cotes, A. (1997). Método rápido y confiable para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 23, 113-118. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000098&pid=S0123-3475200800020001000026&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000098&pid=S0123-3475200800020001000026&lng=en)

Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En Facultad de Medicina de la Universidad de la República, *Temas de bacteriología y virología médica* (2.ª ed., pp. 23-42). <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiyEstructuraBacteriana.pdf>

Public Health England (PHE), & National Health Service (NHS). (2015). UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Bacillus* species. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/697260/ID\\_9i3.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf)

Public Health England (PHE), & National Health Service (NHS). (2019). UK Standards for Microbiology Investigations (UK SMI): General information. *Gov.uk*. <https://www.gov.uk/guidance/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Public Health Wales, National Health Service (NHS), & Health Protection Agency. (2010). Indole test. <http://hemltd.ru/publications/sections/Normativ/foreign/samples/medicine/NHS019/article.pdf>

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., & Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 5, artículo 753. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00753>

Rao, P. R., & Kavya, P. (2014). Production, isolation and purification of peroxidase using *Bacillus subtilis*. En *2014 1<sup>st</sup> International Congress on Environmental, Biotechnology, and Chemistry Engineering* (IPCBE, vol. 64, pp. 21-27). <https://doi.org/10.7763/IPCBE>

Raymond C., K., Rojas B., F., Benavides O., E., Cotes, A. M., Villamizar, L., Ronderos J., V., & García M., P. (2004). Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): uso de activadores de patogenicidad. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882004000100001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100001)

Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 22(2), 106-109. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>

Rico, M., Piattoni, C. V., González, C., Monela, R., Latorre, M. G., & Lurá, M. C. (2005). Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Fabricib*, 8, 163-172. <https://doi.org/10.14409/fabricib.v8i1.744>

Robertsen, B. K., Åman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1981). Host-symbiont interactions. *Plant Physiology*, 67(3), 389-400. <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.389>

Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.

*Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6)

Rubio C., S. A., Vargas A., B. I., & López-Ávila, A. (2004). Evaluación de la eficiencia de *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el control de *Teda solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 107-114. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882004000100016&lng=es&nrm=is&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100016&lng=es&nrm=is&tlng=es)

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>

Seifert, K. (1996). *Fuskey-Fusarium interactive key*. Agriculture and Agri-Food Canada.

Sharaf, E. F., El-Sayed, W. S., & Abosaif, R. M. (2014). Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.03.006>

Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther IV, N. W. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En S. Sariaslani, & G. M. Gadd (eds.), *Advances in applied microbiology* (vol. 86, pp. 145-197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>

Sosa López, A. I., Pazos Álvarez-Rivera, V., Torres Campos, D., & Casadesús Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1562-30092011000100006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092011000100006&lng=es&tlng=es)

Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4151-4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>

Sukarno, N., Kurihara, Y., Park, J.-Y., Inaba, S., Ando, K., Harayama, S., Ilyas, M., Mangunwardoyo, W., Sjamsuridzal, W., Yuniarti, E., Saraswati, R., & Widyastuti, Y. (2009). *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience*, 50(5), 369-379. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0493-1>

Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., & Ramakrishnan, B. (2017). Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiological Research*, 204, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.07.007>

Torres, R., & López, A. (1997). Estudios básicos para el control microbiológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1-2), 83-88.

Torres-Torres, L., & Cotes, A. M. (1999). Actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual y combinada.

## Capítulo IV. Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMCB)

*Revista Sociedad Colombiana de Entomología*, 25(3-4), 121-129. <http://noesis.uis.edu.co/bitstream/123456789/30354/1/120982.pdf>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

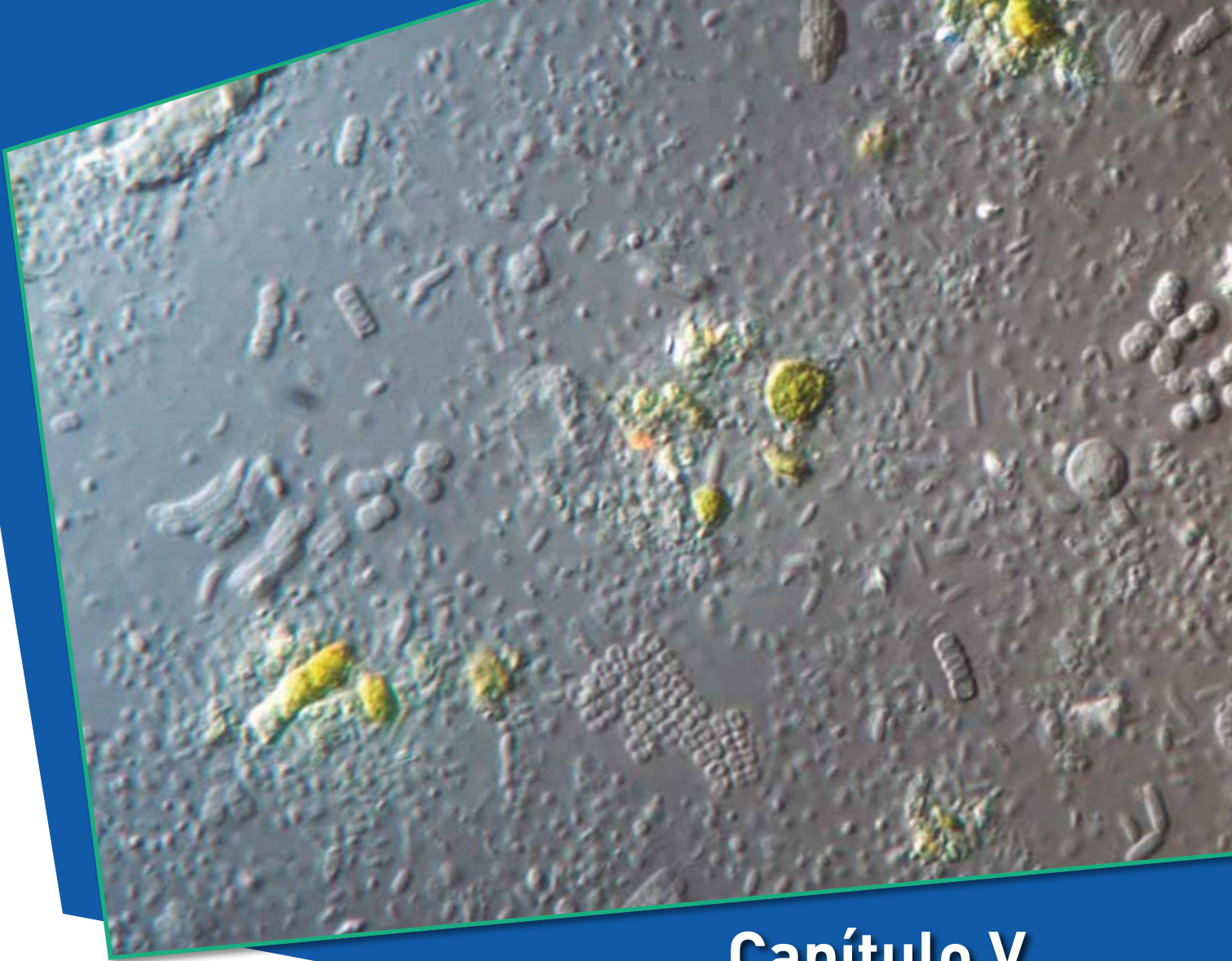
Wang, J., & Zheng, C. (2012). Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Microbiological Research*, 167(2), 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.002>

World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). *Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*. [http://www.wfcc.info/pdf/Guia\\_WFCC\\_espa\\_ol.pdf](http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf)

Yadav, A. N., Kumar, R., Kumar, S., Kumar, V., Sugitha, T. C. K., Singh, B., Singh Chauahan, V., Singh Dhaliwal, H., & Kumar Saxena, A. (2017). Beneficial microbiomes: Biodiversity and potential biotechnological applications for sustainable agriculture and human health. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(6), 45-57. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50607>

Yang, H.-J., & Sung, Y. (2011). Biocontrol of mildew with *Bacillus subtilis* in bitter melon (*Momordica charantia* L.) seeds during germination. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.017>

Zare, R., & Gams, W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research*, 112(7), 811-824. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.019>



## Capítulo V

↑ Microbiota en fluido ruminal bovino, CMINA

125

### Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA)

Juan Camilo Ovalle Másmela  
Lina Marcela Botero Rute  
Rocío Fenney Herrera León  
Fernando Rodríguez Villamizar  
Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.  
Autor de correspondencia: Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal; correo electrónico: [hjimenez@agrosavia.co](mailto:hjimenez@agrosavia.co)

La CMINA conserva 164 accesiones de bacterias, divididas en dos grandes grupos: el primero está conformado por bacterias anaerobias aisladas del tracto gastrointestinal de algunos herbívoros domésticos y silvestres, entre los cuales se encuentran razas de bovinos criollos, chigüiro, danta y agutí; el segundo grupo corresponde a bacterias ácido-lácticas aisladas de ensilajes de avena y maíz del altiplano cundiboyacense. Adicionalmente, la colección cuenta con 4 accesiones de hongos anaerobios ruminales. Los microorganismos contenidos en esta colección son nativos y de interés pecuario, principalmente, y esta fue conformada a partir de colectas realizadas en el país, por lo que representan una riqueza genética de la diversidad microbiana colombiana. Con el fin de conservar esta diversidad y evitar su erosión y pérdida, se requiere la implementación de técnicas de conservación a largo plazo, efectivas y a bajo costo, que garanticen la preservación de las características genéticas y fisiológicas de los microorganismos que la componen.



Bacterias en fluido ruminal, CMINA ↑

Importantes esfuerzos han sido realizados para la implementación de técnicas de conservación a largo plazo, como la criopreservación a temperaturas de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , además del estudio de protocolos para la implementación de la liofilización, procesos que buscan asegurar la identidad genética y la actividad biológica de los microorganismos; sin embargo, el grupo de investigación asociado a la colección se mantiene en constante búsqueda de otras alternativas de conservación, eficaces y a bajo costo, para garantizar la integridad de las accesiones y de sus copias o duplicados de seguridad. Por otro lado, las condiciones de conservación de microorganismos de origen ruminal requieren de mayor estudio, dado que son sensibles a las condiciones ambientales naturales, motivo por el cual deben replicarse las condiciones del rumen para su cultivo, mantenimiento y posterior conservación.

Para el caso de los hongos ruminales de la CMINA, la conservación en nitrógeno líquido ha afectado, con el tiempo, la viabilidad de estas accesiones, lo que ha llevado a mantener el estudio de nuevas metodologías de conservación para este tipo de microorganismos. Además de la autenticación y caracterización

de las cepas de la colección a partir de atributos como la morfología, la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), las variables cinéticas y la producción de algunas enzimas, la colección almacena la información en bases de datos que garantizan su trazabilidad, además de que cuenta con pasaportes de cada cepa en aras de conservar una colección lo más cercana posible a los estándares internacionales.

Cabe agregar que el mantenimiento y control de calidad de las cepas hace parte de los procedimientos de rigor en una colección de microorganismos, razón por la cual esta tarea es tan importante para la CMINA. Así, teniendo en cuenta que las accesiones se almacenan por largos periodos de tiempo, se hace una revisión periódica de su viabilidad para garantizar que se mantenga en el tiempo o que, por lo menos, disminuya muy lentamente.

## Los rumiantes

Los rumiantes han sido uno de los aliados clave para la supervivencia de los humanos, no solo por proveer proteína de buena calidad, sino también por ser fuente de abrigo, transporte, fuerza, religión y herramientas. Los rumiantes comprenden el suborden Ruminantia, el orden Artiodactyla y la clase Mammalia. Actualmente hay más de 180 especies de rumiantes que varían en tamaño y habitan diferentes áreas geográficas del mundo. Estos animales herbívoros poseen la habilidad de convertir los forrajes en carne y leche (figura 27), característica que se basa en la posibilidad de degradar los hidratos de carbono estructurales presentes en los forrajes gracias a la acción de microorganismos anaerobios que habitan en el rumen (Jami et al., 2014; Krause et al., 2003).



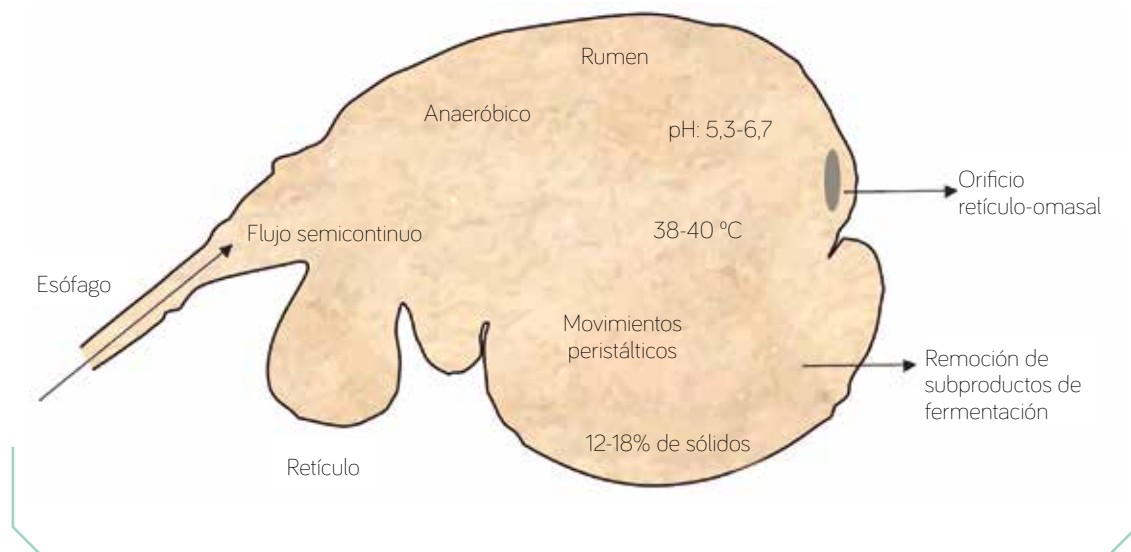
**Figura 27.** Bovino de la raza Criolla Casanare.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Juan Camilo Ovalle Masmela

## El retículo-rumen

Este órgano es una cámara de fermentación con capacidad de almacenamiento variable en los rumiantes en la cual se almacenan los alimentos que ingiere el animal y donde son fermentados por las poblaciones microbianas (Dehority, 2002). El retículo-rumen se localiza en el lado izquierdo de la cavidad abdominal del animal y está dividido en sacos y varios pilares (figura 28). Para el caso de la región del retículo, el epitelio forma pliegues que conforman una estructura en forma de panal, mientras que, en cuanto al rumen, la pared ruminal está cubierta de papilas en las que ocurren los procesos de absorción (Hofmann, 1989; Van Soest, 1994, capítulo 3). Es importante resaltar que el rumen no es un órgano glandular, razón por la cual no secreta enzimas digestivas capaces de hidrolizar los constituyentes que conforman el tejido vegetal de los forrajes que consumen los rumiantes. Una vez el forraje se aloja definitivamente en el rumen después de ser triturado por la acción mecánica de la masticación y un periodo de rumia, es activamente colonizado y transformado por la acción de los microorganismos anaerobios, con la ayuda de los movimientos peristálticos de la pared del rumen (Theodorou & France, 2005).

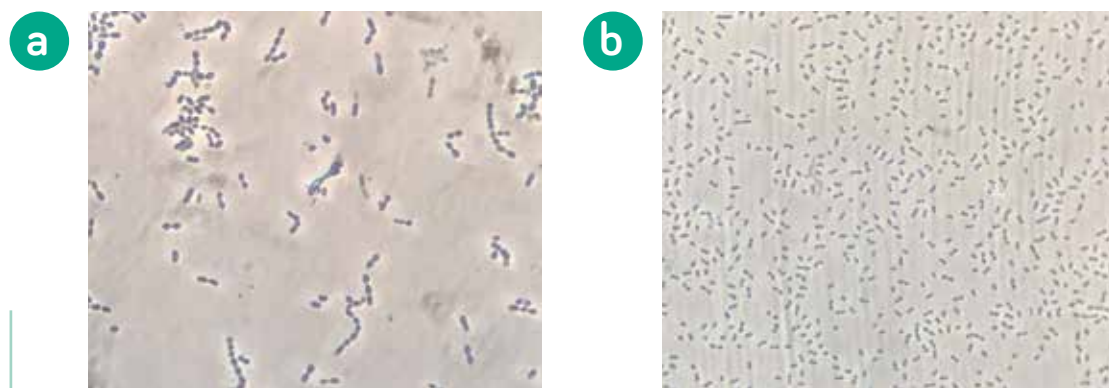


**Figura 28.** Modelo esquemático del rumen.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Hugo Rodolfo Jiménez

## Microorganismos del rumen

La mayoría de los rumiantes del mundo todavía se alimenta principalmente de dietas basadas en forrajes, los cuales son triturados por procesos de masticación y rumia que mejoran el desempeño de los microorganismos en el rumen al degradar los componentes solubles e insolubles de los tejidos vegetales (Theodorou & France, 2005). Los microorganismos se adhieren y colonizan los tejidos vegetales infligiendo un daño físico que permite la penetración de la totalidad de las células vegetales. A lo largo de este proceso, los microorganismos liberan diversas enzimas que hidrolizan las complejas cadenas de polisacáridos de la fibra en azúcares más simples como monómeros y dímeros (Krause et al., 2003; Theodorou & France, 2005). Los mismos microorganismos fermentan estos azúcares y producen diferentes AGV, como el acético, el propiónico y el butírico, principalmente, así como metano y dióxido de carbono. Aunque el animal eructa los gases al ambiente, los AGV se absorben a través de la pared del rumen y luego son conducidos por el torrente sanguíneo, donde finalmente se convierten en azúcares y lípidos requeridos por el animal para la producción de energía y la construcción de tejidos. En cuanto a la proteína microbiana producida durante este proceso, esta se hidroliza a aminoácidos y péptidos, y luego cada aminoácido se desamina a amoníaco y un ácido graso. Parte del amoníaco, la energía y otros productos del metabolismo microbiano, junto con algunos componentes del alimento, proporcionan los materiales para la síntesis de nuevas células microbianas. El resto de las proteínas y energía generadas por la transformación de los tejidos vegetales ingeridos por el animal se utilizan en los procesos de crecimiento, mantenimiento y producción (Cammack et al., 2018).

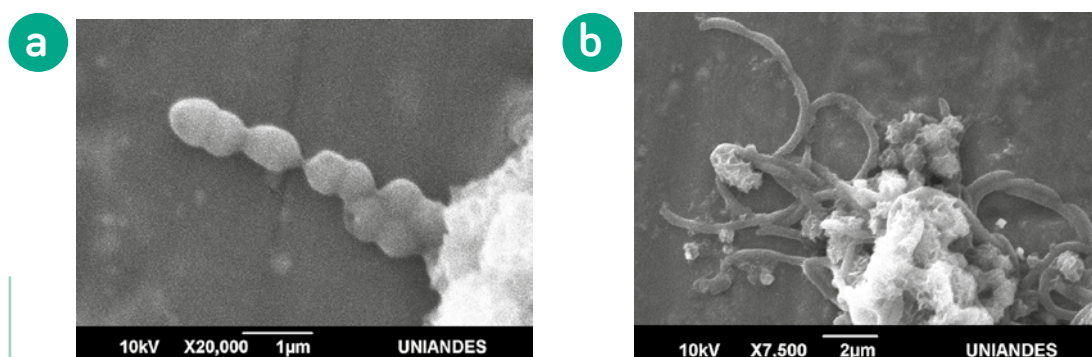


**Figura 29.** Bacterias anaerobias ruminales en fresco. *a. Streptococcus bovis*; *b. Ruminococcus flavefaciens*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Juan Camilo Ovalle Másmela

## Bacterias

Las bacterias son el grupo predominante en el rumen: se calcula que el 95 % de las células ( $10^{10}$ - $10^{11}$  células/g de contenido) corresponden a este grupo, y su biomasa representa del 70 al 80 % del total de los microorganismos allí presentes (Fouts et al., 2012; Puniya et al., 2015; Theodorou & France, 2005). Debido a su amplia diversidad metabólica, se ha considerado clasificar a las bacterias según la preferencia de uso de sustratos y la producción de subproductos de la fermentación (Cammack et al., 2018). Con base en lo anterior, las bacterias se pueden clasificar en degradadoras de celulosa, hemicelulosa y almidón; utilizadoras de ácido; bacterias proteolíticas, y bacterias lipolíticas, entre otras; algunas especies se encuentran en dos o más de estas categorías (Edwards et al., 2004; McSweeney et al., 2005). Para el caso de dietas ricas en fibra, que contienen celulosa y hemicelulosa, las bacterias más representativas son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola* (figuras 29 y 30) (Domingues Millen et al., 2016).



**Figura 30.** Bacterias anaerobias ruminales de la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) en microscopía electrónica confocal. **a.** *Streptococcus bovis*; **b.** *Butyrivibrio fibrisolvens*.

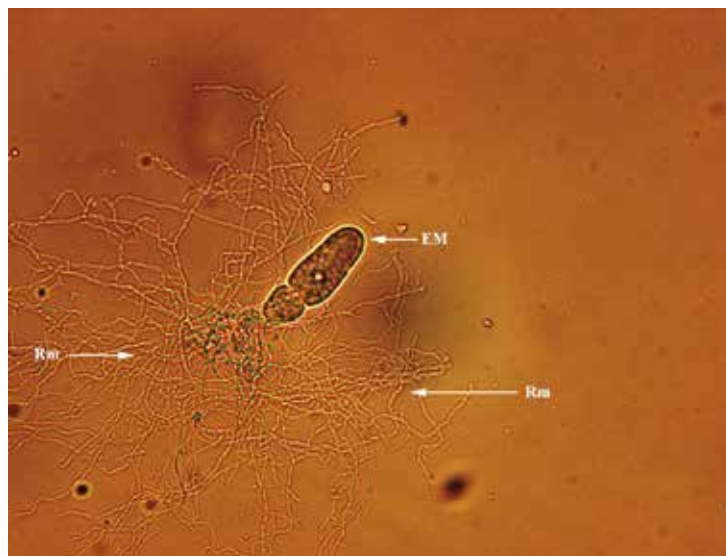
Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes

## Hongos

Los hongos del rumen son un grupo inusual de microorganismos zoospóricos simbióticos que desempeñan una función relevante en la colonización y transformación de los tejidos vegetales en el rumen (Orpin, 1975). Estos microorganismos son anaerobios obligados y su abundancia podría llegar hasta el 20 % de la biomasa microbiana total (según el método de cuantificación) en el rumen (Rezaeian et al., 2004); sin embargo, su contribución a la degradación

de los tejidos vegetales aún no se ha determinado con exactitud. Poseen una maquinaria enzimática compleja necesaria para la descomposición de los componentes de la pared celular de la planta, incluidas las celulasas, xilanasas, mannasas, esterasas, glucosidasas y glucanasas (Gruninger et al., 2014). Además de su potencial enzimático, los hongos pueden fracturar físicamente los tejidos vegetales y, así, facilitar los procesos de colonización microbiana (Akin & Borneman, 1990). El ciclo de vida de los hongos se alterna entre una etapa de zoospora (móvil) y una etapa vegetativa (no móvil) (figura 31). Las zoosporas producidas en el esporangio son atraídas a los tejidos vegetales recién ingeridos, presumiblemente por la respuesta quimiotáctica a azúcares solubles o ácidos fenólicos (Windham & Akin, 1984; Wubah & Kim, 1996). Las zoosporas liberadas se adhieren a los fragmentos de alimento, donde se enquistan y posteriormente germinan para producir un talo compuesto de rizoides y esporangios. El sistema rizoidal puede ser altamente ramificado y puede penetrar profundamente en los tallos de las plantas, con lo que ayuda a la degradación de los componentes de la pared celular. Los hongos anaerobios han sido clasificados en una sola familia, Neocallimasticaceae, dentro del filo Neocallimastigomycota, recientemente establecido. Actualmente, se han descrito once géneros de hongos anaerobios: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Orpinomyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontomyces*, *Feramyces*, *Pecoramyces* y *Liebetanzomyces* (Gruninger et al., 2014; Joshi et al., 2018).



**Figura 31.** Hongo anaerobio ruminal monocéntrico en microscopía convencional.

Nota: Rm: rizomicelio filamentoso; EM: esporangio maduro.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: : Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

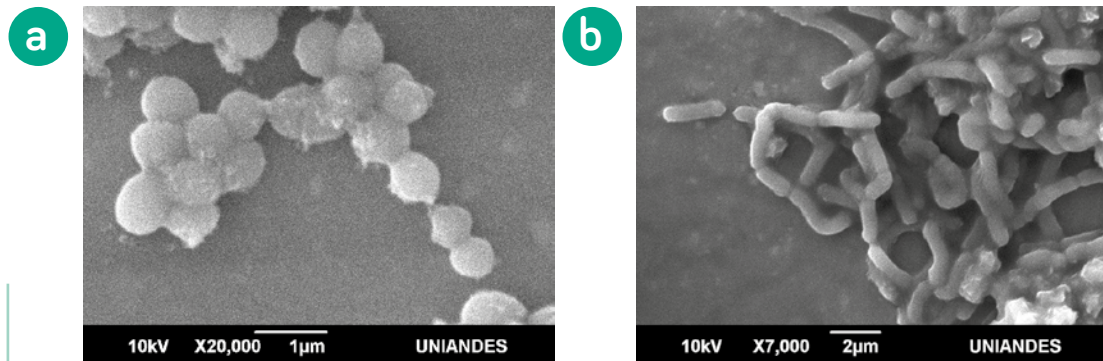
## Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos anaerobios facultativos, Gram-positivos, no pigmentados, no esporulados y catalasa-negativos. Estos tienen la capacidad de fermentar un amplio rango de fuentes de carbohidratos a subproductos como el ácido láctico, el ácido acético y el CO<sub>2</sub>. También tienen la capacidad de producir moléculas antimicrobiales como las bacteriocinas (Kandler, 1983). La producción de ácido láctico es clave en la conservación de alimentos, ya que se acidifica el medio, lo que evita el deterioro y extiende la vida útil de los productos, además de que actúa como inhibidor para el crecimiento de microorganismos considerados como indeseables. Como característica principal para su crecimiento *in vitro*, las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y además son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Hassan & Frank, 2001; Stanley, 1998).

Las BAL pueden ser aisladas de diversos ambientes naturales, como el tracto gastrointestinal de vertebrados, productos lácteos, suelos y plantas (Narvhus & Axelsson, 2003). De acuerdo con la actual clasificación taxonómica, las BAL se agrupan en el filo Firmicutes, la clase Bacilli y el orden Lactobacillales, que comprende las siguientes familias: Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Lactobacillaceae y Streptococcaceae (Stiles & Holzapfel, 1997). Adicionalmente, según el criterio taxonómico genético, existen doce géneros de bacterias lácticas: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella* (figura 32) (Fox et al., 2017).

Las bacterias lácticas pueden clasificarse también por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bacilos o cocos), la fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativas, heterofermentativas facultativas o heterofermentativas estrictas), el intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes o no halotolerantes) (Drinan et al., 1976; Morales et al., 2011; Ni et al., 2015).

Además de ácido láctico, se ha reportado que las BAL producen otros productos de fermentación con actividad antibacteriana y antifúngica, como ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Ariyapitipun et al., 1999; Drinan et al., 1976; Morales et al., 2011; Ni et al., 2015). Por otro lado, se ha sugerido que las BAL pueden actuar como promotoras del crecimiento en plantas como el repollo y el tomate en la medida que producen compuestos volátiles relacionados con la promoción del crecimiento (Giassi et al., 2016; Parada et al., 1998; Vieco-Saiz et al., 2019).



**Figura 32.** Bacterias ácido-lácticas de la CMINA en microscopía electrónica confocal. **a.** *Pediococcus acidilactici*; **b.** *Lactobacillus rhamnosus*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.  
Autor: Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes

## Cultivo de microorganismos anaerobios

Para el aislamiento de microorganismos anaerobios ruminales, se debe tener en cuenta los siguientes materiales. Con respecto a los microorganismos, se debe recordar su sensibilidad a las condiciones aerobias normales.

### Redes de gasificación

Es importante contar con una red de gases, ya sea por tubería de cobre o por mangueras de silicona flexible; el calibre y grosor será el requerido según el tipo de acople de la manguera (figura 33).



**Figura 33.** Acoples utilizados para la red de gases de CO<sub>2</sub>.  
Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.  
Autor: Lina Marcela Botero

La red de gasificación debe contar con agujas de cánula en acero inoxidable (1,5 × 150 mm) (figura 34) acopladas a la red. Respecto de los gases necesarios para generar una atmósfera anaerobia, se recomienda el uso de cilindros de gas con CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o en mezcla de gases CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (80:15:5) libres de oxígeno (menos de 5 ppm) y de alta pureza (Cox & Mangels, 1976).



**Figura 34.** Aguja de gasificación de cánula en acero inoxidable.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

Para los puntos de distribución de medios de cultivo, es necesario contar con o elaborar un sistema de gasificación para tubos anaerobios (figura 35); este sistema permitirá garantizar que los medios de cultivo se mantengan anaerobios gracias a la atmósfera reducida en O<sub>2</sub>.



**Figura 35.** Montaje de gasificación para tubos tipo Hungate y Blach.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

## Ambientes anaerobios

Los microorganismos anaerobios requieren de condiciones anoxigénicas para su crecimiento y viabilidad, por lo que existen diferentes ambientes que pueden asegurar la atmósfera necesaria para su desarrollo. La colección CMINA realiza sus procesos en cámara anaeróbica (figura 36). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el oxígeno es eliminado de la cámara gracias a un catalizador de paladio que reacciona con una mezcla de gases que contiene  $H_2 \leq 5\%$  y forma agua. Para asegurar el ambiente anaerobio, la cámara cuenta con una esclusa de vacío programable que permite reducir los niveles de oxígeno contenidos en los materiales, y además previene el contacto con las condiciones ambientales externas. Una de las ventajas de la cabina es que permite el ajuste de dos temperaturas dentro del globo, una temperatura general y otra que se da gracias a la incubadora integrada. La cámara está hecha de PVC flexible y cuenta con un marco de aluminio.



**Figura 36.** Cámara anaeróbica usada en la CMINA.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

Los procesos anaeróbicos también pueden llevarse a cabo en jarras de anaerobiosis (figura 37), las cuales están diseñadas para una capacidad específica y son aptas para tubos y cajas de Petri tanto de vidrio como de plástico. Las jarras deben llevar en su interior un generador de  $CO_2$ ; la absorción del

oxígeno ocurre en 30 minutos y genera niveles de oxígeno menores al 1 %; el interior de la jarra se mantiene en un nivel del 9 al 13 %.



**Figura 37.** Jarra de anaerobiosis.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

Otro método para garantizar las condiciones anoxigénicas es el uso de la cámara anaeróbica portátil, la cual consta de una bolsa hermética que permite la entrada del material a trabajar, así como la entrada de gases, mediante una manguera ubicada en un extremo de esta, lo que permite trabajar bajo diversas condiciones de atmósfera, según se requiera; su principal utilidad se da en salidas de campo, ya que permite manipular muestras que requieran estar protegidas de las condiciones ambientales normales, además de su fácil uso y transporte. Para su uso, se requiere de cilindros pequeños de gases para su purga y llenado.



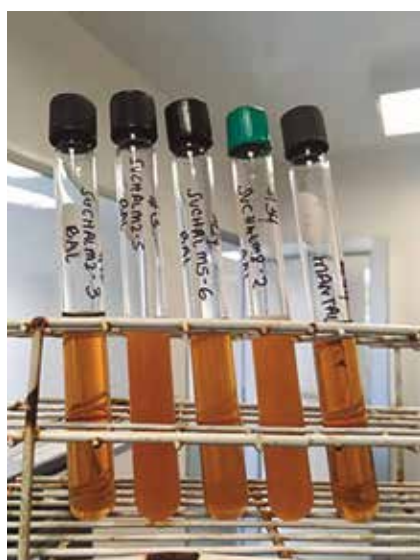
**Figura 38.** Cámara anaeróbica portátil.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

## Tubos de cultivo

El material de vidriería utilizado para la elaboración de los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos, debe ser específico para este uso, por lo que se cuenta con dos tipos de tubo de cultivo que garantizan que la condición anaerobia se mantenga. El primer tipo de tubo es el Hungate, hecho de vidrio de borosilicato tipo 1, clase B, que se utiliza con un tapón de caucho butilo y una tapa rosca con abertura de 9 mm que permite la entrada de agujas al interior sin cambiar la atmósfera interna; la importancia de los tubos yace en el tipo de tapón, que debe ser de butilo, ya que evita el paso de oxígeno al interior del tubo (figura 39).

Por otro lado, el segundo tipo de tubo es el Blach (figura 40), útil para el método de *roll-tube* y para el aislamiento de hongos anaerobios; además, el diámetro de la boquilla permite una mejor manipulación para el aislamiento de colonias. Los tubos utilizan un tapón de butilo sostenido en un agrafe de aluminio; la manipulación de los agrafes necesita de un agrafador (la estructura que sostiene los tubos en la figura 39), ya que es la única manera de asegurar y quitar el agrafe.



**Figura 39.** Tubo tipo Hungate con tapón de butilo y tapa rosca.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Juan Camilo Ovalle Masmela



**Figura 40.** Tubo tipo Blach con tapón de butilo, agrafe y agrafador/desagrafador.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

## Soluciones

Entre las soluciones que se utilizan para el cultivo de microorganismos anaerobios se encuentran las soluciones *buffer*, la solución de conservación anaerobia, la solución de AGV (composición en mL/L: ácido acético: 17; ácido butírico: 4; ácido propiónico: 6; ácido isobutírico: 1; ácido 2-metil-butírico: 1; ácido n-valérico 1; ácido isovalérico: 1, mezclados en un frasco ámbar y almacenados a 4 °C) y la solución indicadora de anaerobiosis; dichas soluciones son esenciales para la elaboración de medios de cultivo anaerobios y su implicación en el desarrollo de los microorganismos ruminales (Rodríguez et al., 2011).

Para la preparación de la solución de dilución anaerobia se utiliza la mezcla de las sales I y II (composición en g/L: sal I:  $K_2HPO_4$ : 3; sal II:  $KH_2PO_4$ : 3;  $[NH_4]_2SO_4$ : 6; NaCl: 6;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 1,23;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ : 0,79; disolver en el volumen requerido, mezclar en plancha de agitación y almacenar a 4 °C en botella ámbar); para un volumen de 100 mL, se agregan 15 mL de cada sal, 0,6 g de  $Na_2CO_3$ , 0,1 mL de solución indicadora de resazurina (0,1 g de resazurina en 100 mL), 40 mL de agua destilada y 0,1 g de HCl-cisteína. La solución debe ser reducida, gasificada y, finalmente, esterilizada en autoclave.

Para realizar la solución de conservación anaerobia, se debe preparar solución de dilución anaerobia y mezclarse con un 15 % (p/v) de glicerol; la solución debe reducirse en condiciones de ebullición, distribuirse en tubos Hungate y, finalmente, esterilizarse en autoclave.



## Medios de cultivo

La literatura ha reportado varios medios de cultivo para recuperar, según las necesidades concretas, microorganismos anaeróbicos ruminales. La tabla 8 muestra una serie de medios de cultivo usados por la colección para este fin.

**Tabla 8.** Medios de cultivo empleados en la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) para el aislamiento de microorganismos ruminales anaerobios.

Fuente	G/C*	CMC**	Xilán	Dilución
Carbono	Glucosa y celobiosa	Carboximetilcelulosa	Xilán	No aplica
Nitrógeno	Extracto de levadura	Extracto de levadura	Extracto de levadura	No aplica
Minerales	Sal I y sal II	Sal I y sal II	Sal I y sal II	Sal I y sal II
Vitaminas	Fluido ruminal	Fluido ruminal	Fluido ruminal	No aplica
AGV	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico
Otras	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína

\* G/C: glucosa/celobiosa. \*\* CMC: carboximetilcelulosa.

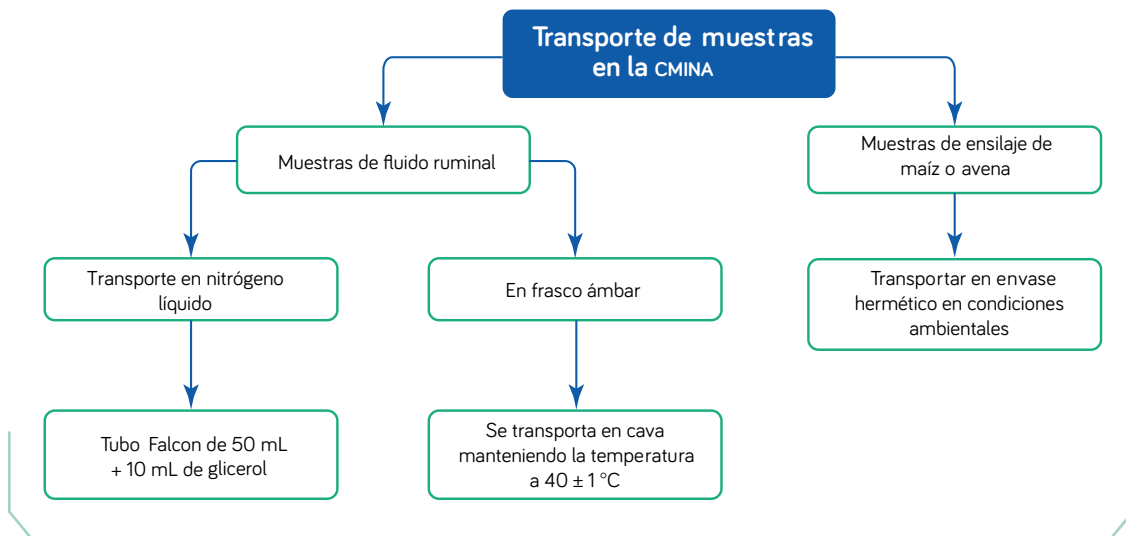
Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

El mantenimiento de los medios de cultivo bajo condiciones anaerobias requiere el uso de agentes reductores de oxígeno, como el tioglicolato de sodio, el HCl-cisteína, el sulfuro de sodio nonahidratado, el ditioneol y el ditionito.

En la CMINA se utiliza resazurina y HCl-cisteína, que, en condiciones de ebullición y gasificación con CO<sub>2</sub>, respectivamente, permiten la identificación y reducción completa del oxígeno presente en el medio de cultivo; aunque se utilizan principalmente para la preparación de caldos de cultivo, también tienen aplicabilidad en agar. La acción de la resazurina está mediada por la presencia-ausencia de oxígeno en el medio de cultivo; es así como, en la preparación, el medio se debe mantener en ebullición hasta alcanzar el punto de viraje de azul violeta a incoloro; sin embargo, cabe recalcar que el volumen preparado debe ser mayor al deseado, puesto que puede evaporarse. Para finalizar la reducción del medio, se debe añadir HCl-cisteína y proceder a gasificar mínimo 30 minutos antes de ser dispensado y esterilizado (Rodríguez et al., 2011).

## Aislamiento y cuantificación

La CMINA hace uso de diferentes técnicas de aislamiento y cuantificación de microorganismos, los cuales están divididos en dos grandes grupos: bacterias anaerobias ruminales aisladas del tracto gastrointestinal de herbívoros y bacterias ácido-lácticas aisladas de muestras de ensilaje de maíz. Para su aislamiento, es necesario garantizar ciertas condiciones de transporte (figura 41): en el caso de las bacterias ácido-lácticas, es muy simple, ya que estas son bacterias facultativas y únicamente se debe transportar la muestra de ensilaje en un recipiente hermético debidamente rotulado; no obstante, en el caso de las bacterias de origen ruminal, la muestra —fluido ruminal— puede ser transportada de dos formas: la primera es en un frasco de vidrio ámbar a una temperatura de entre 39 y 41 °C, para mantener la viabilidad de los hongos ruminales, así como de algunas bacterias fastidiosas sensibles a los cambios de temperatura; la segunda forma de transporte es en nitrógeno líquido, proceso en el que el fluido ruminal es dispensado en tubos Falcon de 50 mL que contienen 10 mL de glicerol.



**Figura 41.** Procedimiento de transporte de una muestra para su aislamiento.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Método de *roll-tube*

La metodología de *roll-tube* ha sido ampliamente utilizada para el aislamiento de microorganismos anaerobios provenientes del rumen, pues posee la ventaja de mantener las condiciones anoxigénicas para la recuperación de bacterias y hongos, principalmente. La técnica fue desarrollada por Hungate (1969) y se basa en partir de una muestra con una concentración alta de microorganismos, la cual debe ser diluida el número de veces que se considere necesario para obtener una menor concentración y, por tanto, garantizar el crecimiento de colonias microbianas fácilmente aislables; el equipo de curadores de la CMINA realiza esta tarea utilizando solución de dilución anaerobia, mientras, paralelamente, se realiza el medio de cultivo sólido de interés, que es preparado en condiciones anaerobias, depositado en tubos tipo Blach con agrafe y esterilizado; el volumen de medio de cultivo para cada tubo es de 4,5 mL.

Después de la esterilización, los medios sólidos se ponen en baño de María a 60 °C para que se mantengan en estado líquido, previo a la inoculación. Para la inoculación, después de atemperar el medio de cultivo (que se mantiene en estado líquido) con agua fría para evitar que los microorganismos mueran al tener contacto con el medio caliente, se toman 0,5 mL de las diluciones con jeringa estéril y se depositan en el tubo Blach con el medio.



**Figura 42.** Crecimiento bacteriano con el método de *roll-tube*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Fernando Rodríguez Villamizar

El medio inoculado debe ponerse en posición horizontal y colocarse sobre una superficie rodante con agua fría, permitiendo que el agar se desplace en todas las direcciones y se solidifique en una capa delgada en el interior del tubo. Una vez solidificados los tubos, se deben incubar de forma inclinada, a 30°, para evitar que el agua formada por sinéresis entre en contacto con las colonias que se forman.

La figura 42 muestra el crecimiento de colonias después del tiempo de incubación bajo la técnica de *roll tube*; de allí, las colonias pueden ser tomadas con asa estéril en cabina de anaerobiosis y repicadas en caldos anaerobios para su crecimiento.

## Número más probable (NMP)

En este método, la muestra de contenido ruminal es diluida serialmente (1:10) en soluciones anaeróbicas; el número de diluciones depende de la turbidez del cultivo madre, pero se calcula que unas nueve son suficientes. De igual forma que con el método *roll-tube*, se inoculan 0,5 mL en el medio, que contiene agar líquido, se inocula por triplicado, y los tubos se incuban a 39 °C con una inclinación de 30°. Finalizado el tiempo de incubación, se cuentan las colonias por réplica, y este valor es promediado entre el número de réplicas para obtener la unidad formadora de colonias (UFC/mL) (Bryant & Burkey, 1953; Hungate, 1957).

Para más practicidad, los laboratorios de anaerobiosis combinan las bondades de cuantificación del método NMP con las facultades de cultivar en medio sólido la dilución de preferencia, lo que permite el aislamiento de los microorganismos más abundantes en un momento determinado. Tres réplicas (tubos) por dilución podrían ser suficientes, pero cuatro o cinco aumentan la precisión de detección del método.

## RT-PCR para cuantificación

Cada especie bacteriana que habita el ecosistema microbiano ruminal porta dentro de su estructura molecular marcadores génicos altamente conservados pero, a la vez, con la suficiente variabilidad para distinguirla entre otras con las que comparte este nicho. Entre los marcadores más conocidos están los genes ribosomales, el citocromo oxidasa y la subunidad beta del ARN polimerasa. Estos marcadores no solo son de alto valor filogenético y discriminatorio, sino que son la sonda molecular que, detectada y cuantificada, permitirá la medición precisa de la abundancia de una especie, un género, una clase, un filo o una población (celulolítica, xilanolítica, proteolítica, entre otras) (Xue et al., 2018).

En otras palabras, si un animal recibe una dieta determinada, el investigador podrá, gracias a esta herramienta molecular, cuantificar los diferentes cambios en los grupos microbianos más dominantes del rumen (bacterias, protozoarios y hongos). A la par, podrá discriminar, dentro de un grupo (verbigracia, bacterias metanogénicas), cuál o cuáles son las especies o géneros más abundantes. Dicha cuantificación puede hoy realizarse en tiempo real mediante el uso de una PCR cuantitativa conocida como PCR en tiempo real (qRT-PCR, por sus siglas en

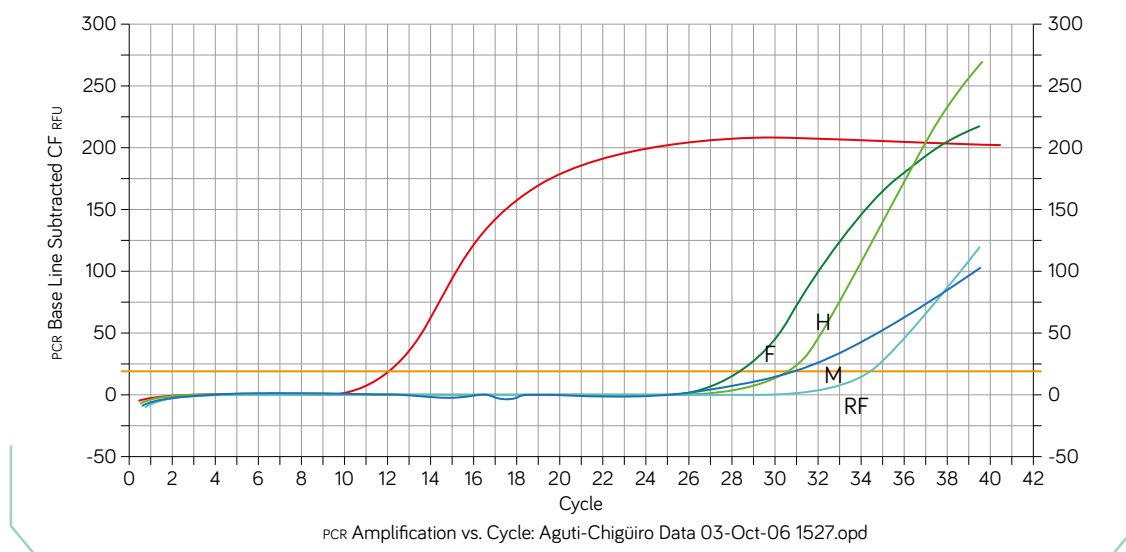
← Protozoo del rumen, *Entodinium* sp., CMINA



inglés). La qRT-PCR, a diferencia de la PCR convencional, no cuantifica cuándo la reacción de amplificación del ADN *target* (marcador o gen) ha alcanzado la fase *plateau*; por el contrario, lo hace en la fase logarítmica de este, ligeramente por encima o por debajo de su propio *threshold*.

La qRT-PCR también está diseñada para amplificar y detectar varios ADN *target* a la vez, y para esto se vale de marcajes previos con fluorocromos de espectro de emisión diferencial (sondas TaqMan) o sencillamente basado en los picos  $T_M$  (temperatura *melting*), en los cuales cada amplicón tiene un sello propio de denaturación de sus cadenas de ADN. Un ejemplo de dicha diferenciación se puede apreciar en la figura 43, en la cual, de manera simultánea, se cuantifica, mediante qRT-PCR, la abundancia de dos de los microorganismos más celulolíticos del rumen, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, las arqueas, las metanogénicas, las bacterias totales y los hongos anaerobios ruminales (Tajima et al., 2001).

La cuantificación de estos microorganismos ruminales con qRT-PCR puede ser tanto absoluta como relativa: en la primera, se utiliza una curva de calibración para cada amplicón específico, para hacer la comparación, la valoración de densidad y el ajuste; en la segunda, cada grupo o especie de microorganismos es comparada de manera relativa con el grupo más abundante de la muestra, que en la mayoría de los casos son las bacterias totales (Denman & McSweeney, 2006).



**Figura 43.** Cuantificación de microorganismos anaerobios en tiempo real.

Nota: H: hongos; F: *Fibrobacter*; RF: *Ruminococcus flavefaciens*; M: bacterias metanogénicas.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Fernando Rodríguez Villamizar

## Métodos de conservación empleados en la CMINA

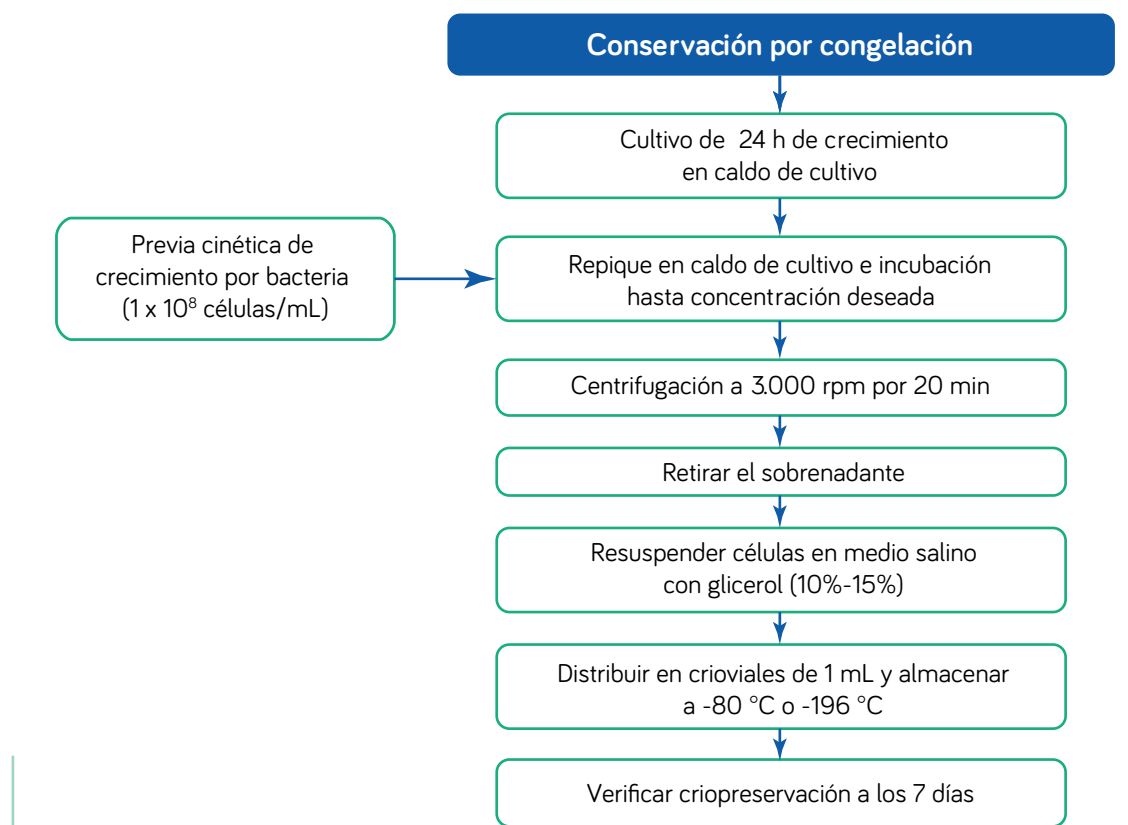
La CMINA utiliza tres métodos de conservación: congelación, liofilización y siembra en intervalos, los cuales son descritos a continuación.

### Congelación de accesiones bacterianas

Las bacterias anaerobias estrictas aisladas del rumen no resisten el contacto con el oxígeno (Scott et al., 1983), por lo cual la condición de conservación es compleja y requiere de procedimientos y equipamiento especiales. En el caso de las bacterias ácido-lácticas, el procedimiento es similar; no obstante, no se requiere garantizar condiciones de anaerobiosis estrictas, sino simplemente mantener una atmósfera de microaerofilia (Archibald & Fridovich, 1981). Es así como las cepas bacterianas son reactivadas en el caldo específico para bacterias ruminales o ácido-lácticas (medio anaerobio o MRS, respectivamente). Las cepas reactivadas son llevadas a incubación durante 24 horas a  $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en el caso de las anaerobias ruminales; por otro lado, las BAL son incubadas a la temperatura que más les favorezca (25, 28, 30, 37 o  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Terminado el tiempo de incubación, se realiza un repique de las cepas llevándolas nuevamente a incubación y deteniendo el crecimiento en el tiempo que corresponda, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria para cada cepa estudiada.

Posteriormente, las células son recogidas por centrifugación a 3.000 rpm. Para limitar la exposición al oxígeno, conviene elegir tubos de incubación que puedan usarse directamente en la centrifugadora. Una vez centrifugado el cultivo, el sobrenadante es eliminado de forma cuidadosa y, posteriormente, el *pellet* es resuspendido en una solución de conservación (solución de conservación para bacterias ruminales/L: sal I: 150 mL; sal II: 150 mL; glicerol: 150 mL; resazurina: 1 mL; bicarbonato de sodio [ $\text{NaHCO}_3$ ]: 6 g; cisteína: 1 g; pH: 7,2; solución de conservación para BAL/L: NaCl: 8,5 g; glicerol: 150 mL), sin formar burbujas y buscando una concentración mínima de  $1 \times 10^8$  células/mL; no obstante, como norma general, la concentración celular de las suspensiones deberá ser lo más alta posible. En el caso de las bacterias ruminales, cabe aclarar que cualquier manipulación inadecuada que suponga un exceso de aireación puede conllevar una pérdida absoluta de viabilidad (figura 44).

Una vez resuspendidas las células, son distribuidas en criotubos (1 mL/criotubo) y almacenadas en criocajas. La verificación de la conservación se realiza reactivando un tubo y evaluando la viabilidad de la cepa en periodos de tiempo establecidos.



**Figura 44.** Procedimiento de conservación por congelación.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Liofilización de accesiones de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las BAL, ya que son catalogadas como GRAS (*generally recognized as safe*) y utilizadas como cultivos iniciadores de productos fermentados, como agentes bioconservadores o como probióticos, han despertado cada vez más interés en los investigadores y se ha incrementado la búsqueda de mecanismos más eficientes para la conservación y el manteniendo en el tiempo de sus características (Tamime & Robinson, 2007).

Por otro lado, si bien las BAL pueden ser conservadas en refrigeración por periodos cortos de tiempo y en congelación por periodos más largos, los

sistemas de entrega de estos métodos no favorecen sus condiciones de viabilidad, por lo que se decidió implementar la liofilización para este grupo de bacterias, con el fin de que su sistema de entrega permitiera reunir características fundamentales para la investigación y la industria. La primera característica está asociada con mantener el mayor número de células viables; la segunda se trata de contar con una accesión libre de contaminantes, y con la tercera, por último, se busca obtener una cepa que mantenga la actividad biológica por la que fue seleccionada y conservada (Zamora Rodríguez, 2003).

El proceso de liofilización de las BAL (figura 45), entonces, está determinado por tres fases: primero, el producto es precongelado para asegurar una estructura inicial sólidamente congelada; después, se procede con el secado primario, cuando el 90-95 % del agua es retirada, y, por último, el producto es sometido a un secado secundario para retirar el agua restante. No obstante, no toda el agua es retirada, y lo que resta representa la humedad residual. Para volver a su estado inicial, los cultivos liofilizados necesitan ser rehidratados y colocados en un medio de cultivo adecuado (Freire, 1999).

Antes de la liofilización de las BAL, se realiza la determinación de viabilidad de las cepas que pertenecen a la CMINA; estas cepas son reactivadas a partir de criovial a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en el caldo MRS al 1 %, y luego son puestas en incubación por 24 horas a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se realiza una nueva inoculación en erlenmeyer, con el caldo MRS, a partir del cultivo con crecimiento, y se incuba bajo la misma temperatura durante el tiempo que tarde en alcanzar el punto final de la fase exponencial de cada cepa. Terminado el tiempo de incubación, se realiza dilución seriada del cultivo y se siembra masivamente con rastillo en cajas de agar MRS, para cuantificar la concentración de cada microorganismo mediante UFC. Las cajas inoculadas son incubadas a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en condiciones de microaerofilia, y luego se realiza la lectura y cálculo de la concentración de cada cepa; este valor permitirá ajustar la concentración final para la liofilización.

Concluido lo anterior, y para iniciar la preparación de los inóculos para liofilización, cada cepa es sometida a un paso de preinoculación de 24 horas en caldo MRS, y a partir de este preinóculo se realiza la obtención del inóculo, ajustado en tiempo y concentración, partiendo de los datos anteriormente obtenidos y bajo las mismas condiciones de temperatura y cultivo. Posteriormente, las cepas con crecimiento son centrifugadas, el sobrenadante es retirado y las células son resuspendidas en solución lioprotectante. El contenido de cada accesión será distribuido en viales de vidrio, garantizando entre 5 y 10 liófilos por cepa. Una vez distribuida la suspensión, se sellan los viales con tapones de caucho y se congelan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

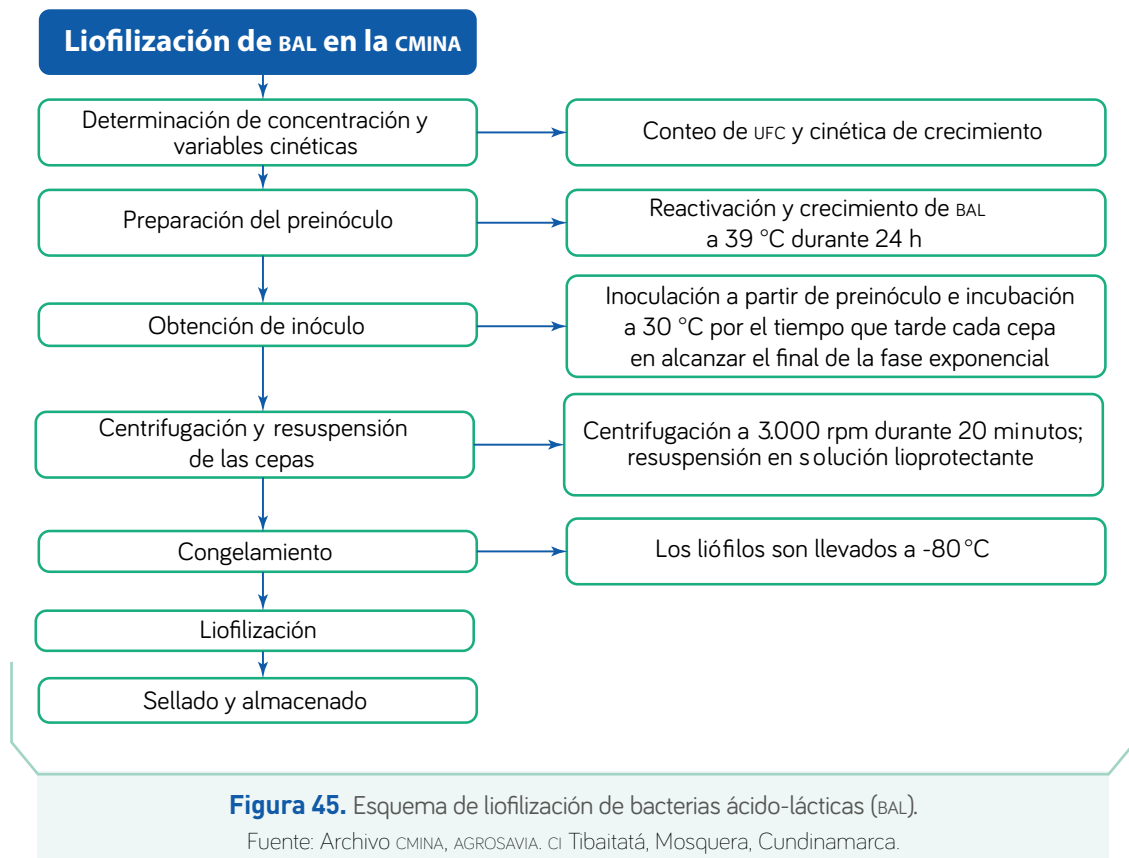
Luego, los viales congelados son sometidos al proceso de liofilización bajo las siguientes condiciones: 24 horas de secado, con una temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de vacío no superior a 1 hPa. Adicionalmente, cada una de las bandejas del liofilizador se programa con un aumento progresivo de temperatura, de la siguiente forma: 5 horas a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 horas a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, finalmente, 4 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; finalizado el proceso de liofilización, se realiza el sellado de los liófilos, al vacío, empleando un compresor de 10 caballos de fuerza. Una vez sellados los viales, son retirados del liofilizador y agrafados con agrafes de aluminio para garantizar la integridad del material biológico liofilizado. Finalmente, los viales son rotulados con el código de la accesión y almacenados en condiciones de temperatura adecuadas.

## Conservación por siembra en intervalos

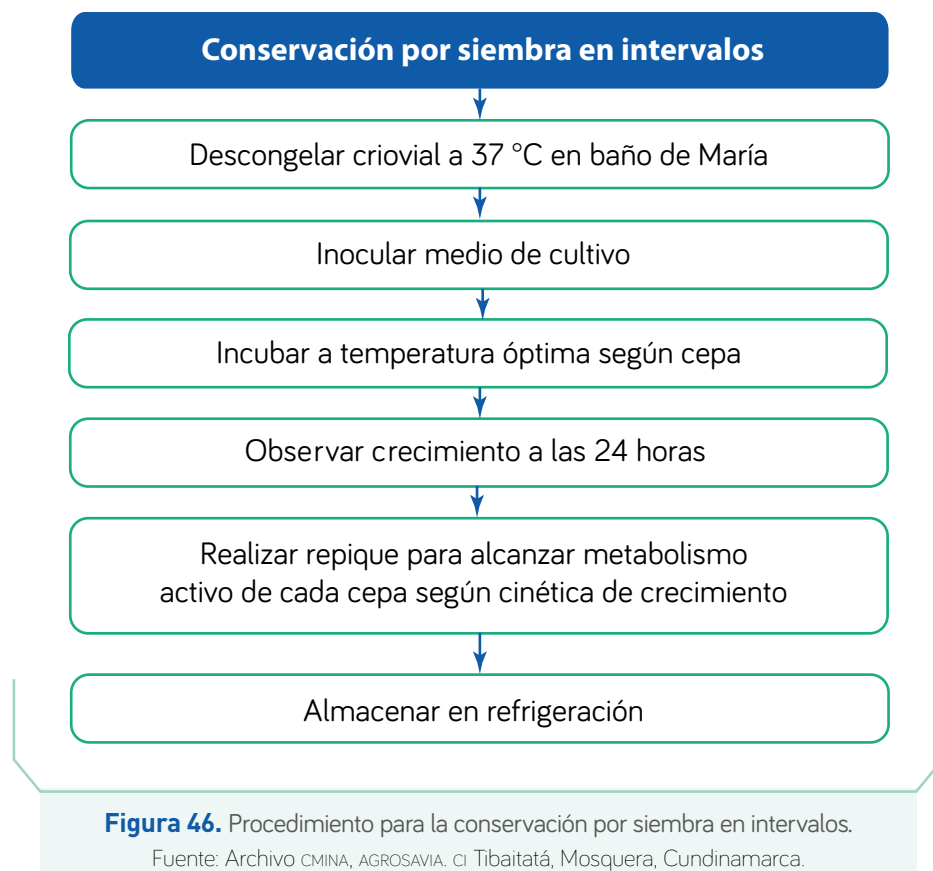
Entre los métodos que se utilizan para la conservación de BAL se encuentra la siembra por intervalos, considerada de corto plazo por los tiempos utilizados entre cada siembra. En las BAL se ha aplicado este método para facilitar el uso continuo de estos microorganismos sin necesidad de recurrir a su reactivación desde criovial; en la colección, las accesiones de BAL han sido caracterizadas por su cinética de crecimiento, lo cual resulta útil para retrasar el envejecimiento de las células y evitar tanto la generación de compuestos tóxicos como la pérdida de estabilidad celular; es así como, al conocer dicho parámetro, podemos realizar la conservación con volúmenes pequeños de inóculo.

*Lactobacillus fermentum* en  
agar MRS., CMINA →



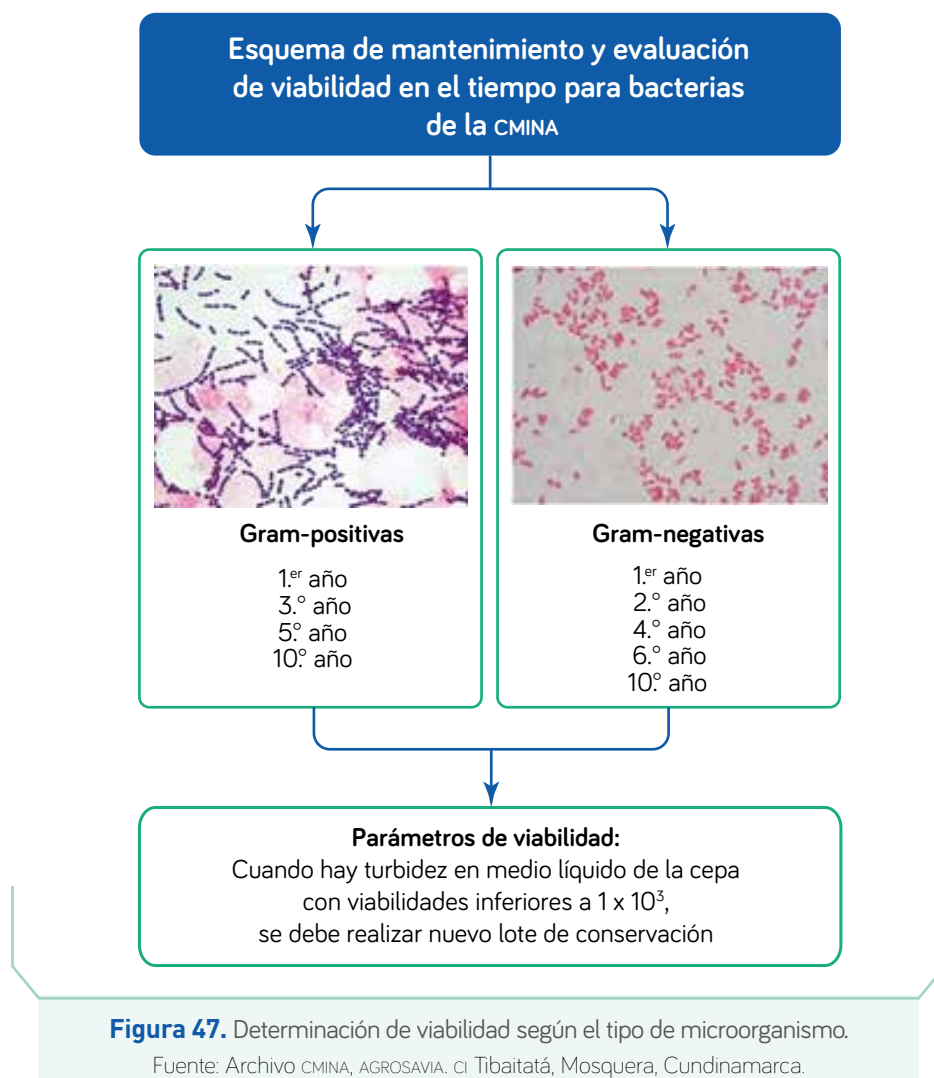


El proceso para esta conservación en BAL consiste en la toma de un volumen específico de un inóculo que surge de la reactivación de un criovial congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y depositado en un tubo con 10 mL de caldo MRS, el cual se deja incubar por 24 horas y sin agitación; después de este tiempo, se toma 1 mL del cultivo crecido y se deposita, nuevamente, en un tubo con 10 mL de caldo MRS (el periodo de incubación dependerá de la cinética de crecimiento del microorganismo); este tubo es considerado como inóculo, que será guardado en nevera, por un periodo corto de tiempo, inmediatamente después del periodo de incubación, para evitar que el crecimiento siga y la fase de muerte aparezca. Este tubo podrá ser guardado y utilizado para hacer “pases” o reactivaciones de forma rápida y sin necesidad de pasar por una fase de activación metabólica (figura 46).



## Viabilidad de las cepas

La viabilidad de las accesiones de bacterias anaerobias ruminales y bacterias ácido-lácticas está determinada por el crecimiento de estos microorganismos en un medio específico bajo condiciones determinadas de temperatura (39 °C), anaerobiosis (CO<sub>2</sub>) y microaerofilia, respectivamente. Las cepas evaluadas fueron previamente conservadas en congelación a -80 °C y son evaluadas, inicialmente, a los siete días del proceso de conservación; no obstante, la viabilidad de las accesiones depende no solo del método de conservación, sino del tipo de microorganismos y sus cualidades fisiológicas. Por tal razón, la CMINA ha establecido tiempos de evaluación de la viabilidad según el estrés por congelación producido por la conservación a largo plazo (figura 47). Sobre ese aspecto, estudios han reportado que las bacterias Gram-negativas son más susceptibles al estrés por congelación y tienden a disminuir o perder su viabilidad y actividad biológica en menor tiempo respecto de las bacterias Gram-positivas, debido a que la estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas es más resistente (Sánchez Leal & Corrales Ramírez, 2005).

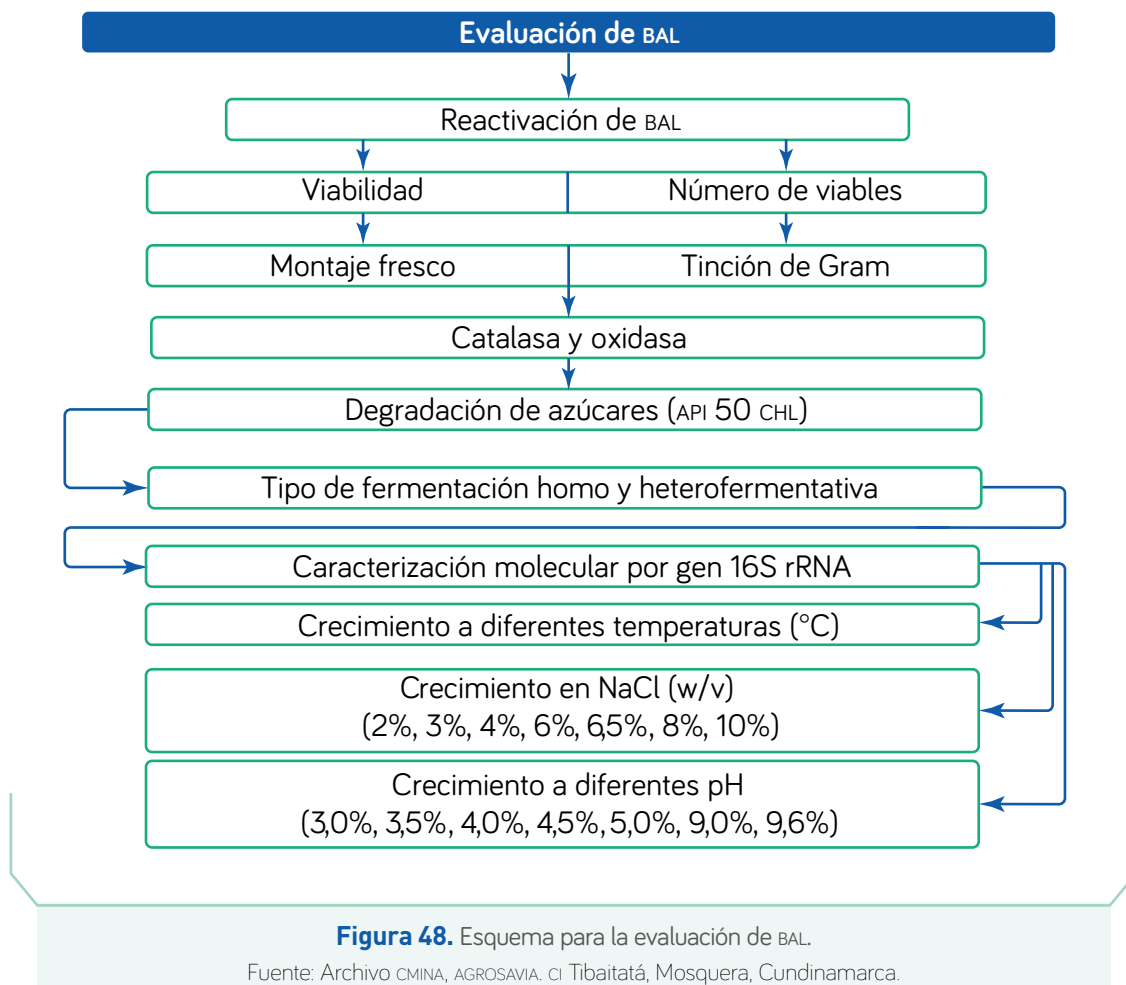


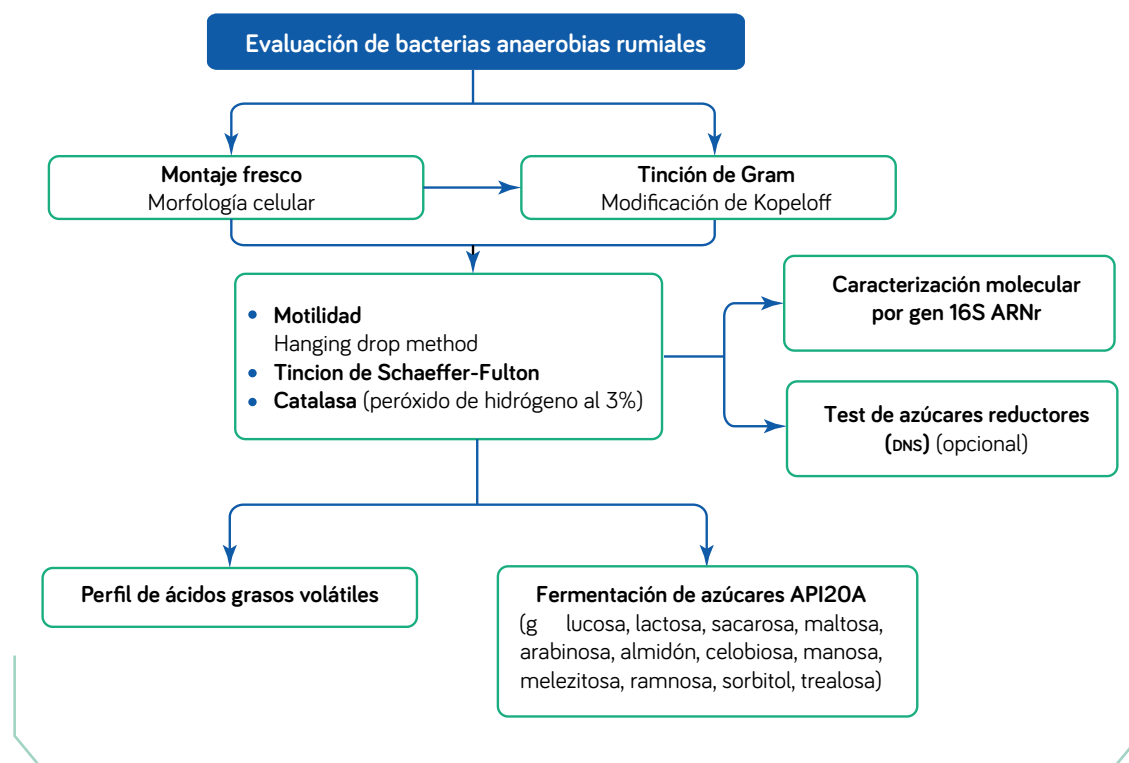
En la CMINA, la prueba de viabilidad se realiza reactivando un criovial en medio de cultivo para anaerobios ruminales con fuente de carbono glucosa (5 %) y celobiosa (5 %) e incubación por 24 horas. Por otro lado, las accesiones de BAL son reactivadas en el caldo MRS y puestas en incubación durante 24 horas. En ambos casos, los crioviales son descongelados por choque térmico en baño de María a 37 °C, con el fin de disminuir el daño celular por descongelación. La viabilidad de las cepas de la CMINA es, entonces, determinada por la turbidez de cada grupo de bacterias en el medio de cultivo.

Adicionalmente, se determina el número de viables de cada cepa, con el fin de identificar si alguna de las accesiones que se están evaluando ha perdido viabilidad y necesita realizarse un nuevo lote de conservación (figura 46).

## Autenticación de cepas

Una actividad fundamental en el mantenimiento y conservación de cepas en una colección de microorganismos es la autenticación de las cepas que se ingresan, conservan y entregan a y por usuarios internos y externos. Al respecto, la CMINA usa diferentes métodos para autenticar sus accesiones; estos procedimientos han sido seleccionados teniendo en cuenta la importancia básica de la autenticación de las cepas de la colección. Así, en las figuras 48 y 49 se presenta todo el esquema de caracterización de una cepa en la CMINA. Dichos procedimientos permiten el estudio en profundidad de cada microorganismo y se realizan con el objeto de buscar el potencial de bioprospección de la diversidad microbiana contenida en la colección.





**Figura 49.** Esquema para la evaluación de bacterias anaerobias ruminales.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

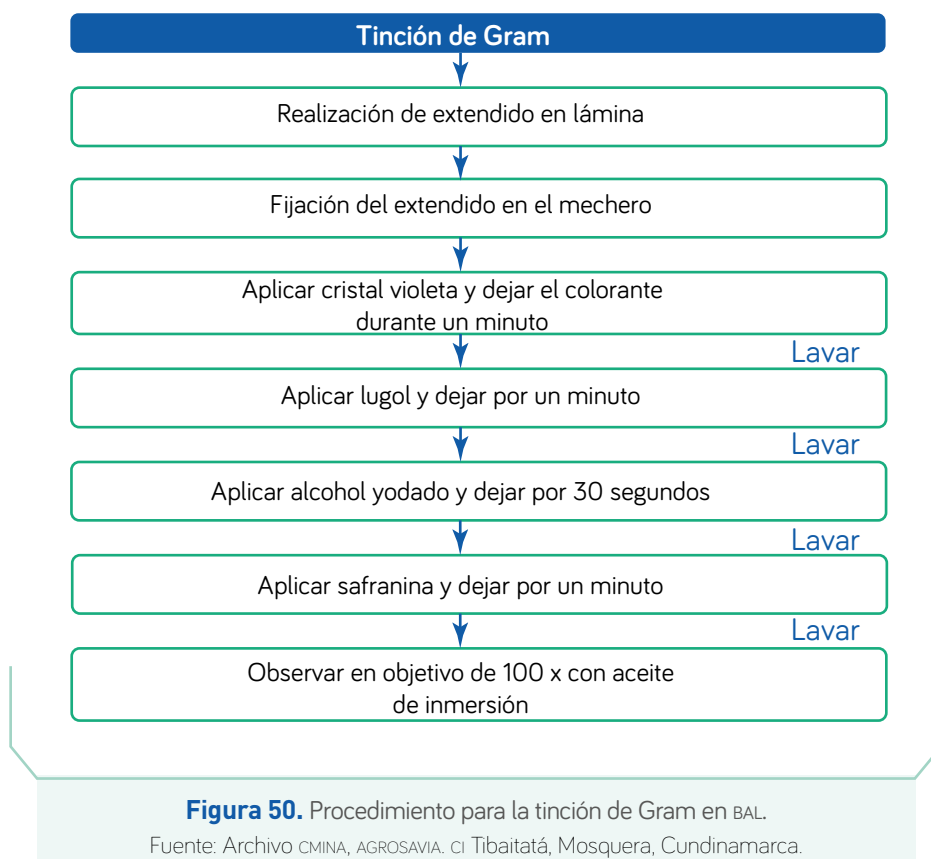
A continuación se describen los principales métodos para la autenticación de BAL y bacterias anaerobias ruminales de la CMINA. Cabe decir que estos son los métodos mínimos, pero estrictamente necesarios, para evaluar la autenticidad de las cepas de la colección.

## Grupo de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Dentro de la CMINA se encuentra una colección de BAL que han sido aisladas de ensilajes de maíz y de avena; este grupo ha sido ampliamente estudiado y caracterizado mediante la tinción de Gram, la prueba de catalasa y oxidasa, el perfil bioquímico y su actividad biológica.

### Tinción de Gram

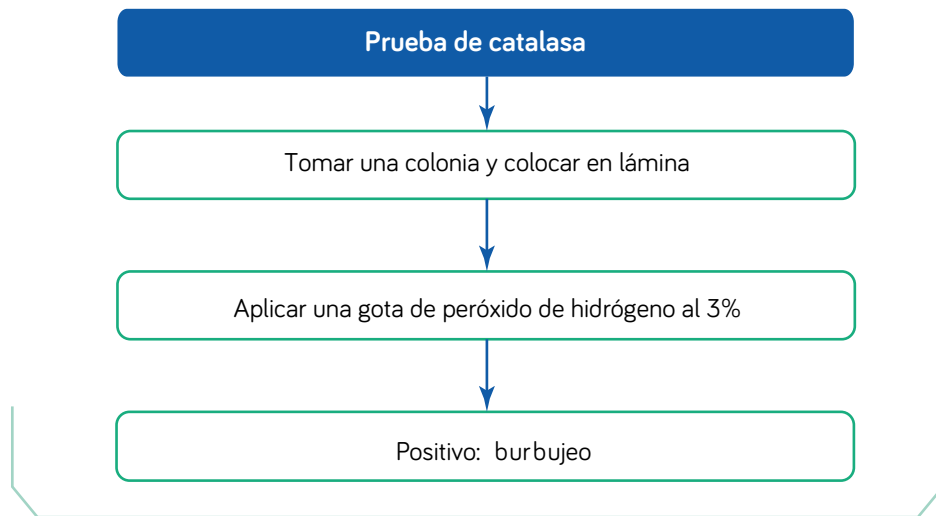
Para la autenticación de las accesiones de BAL, se ha establecido una tinción de Gram estándar (figura 50) como uno de los primeros pasos de verificación (Gerhardt et al., 1981), y el resultado de dicha tinción debe arrojar que la BAL es Gram-positiva; dentro del grupo de las BAL, se destacan los géneros



*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Aerococcus* (Narvhus & Axelsson, 2003), de los cuales los tres primeros se encuentran en la colección.

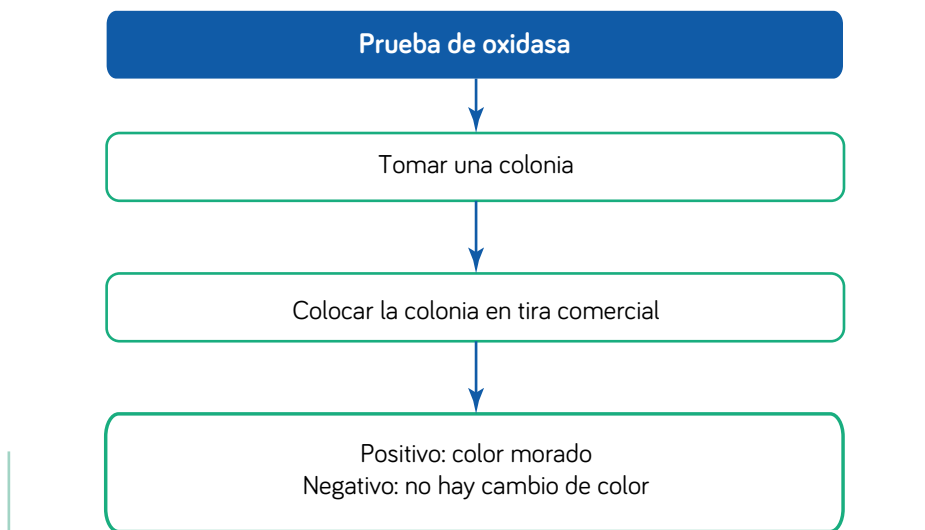
### Catalasa y oxidasa

Para la autenticación de las BAL, es necesario realizar las pruebas de catalasa y oxidasa; las BAL son catalasa y oxidasa-negativas (Settanni & Moschetti, 2010). La prueba de catalasa es realizada con peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3 % en una lámina portaobjetos para cultivos crecidos en agar. Para esto, se debe tomar, con un asa estéril, una muestra de una colonia de un cultivo fresco y depositarla en la lámina portaobjetos; acto seguido, se pone una gota de  $H_2O_2$  sobre la biomasa y se deja actuar. La reacción debe ser negativa, por lo que no debe haber formación de burbujas (figura 51). Para la prueba de oxidasa, por su parte, se cuenta con colonias de un cultivo fresco; después, con la ayuda de un asa estéril, se toma una colonia y se ubica sobre la membrana de una tira comercial de oxidasa. La reacción positiva es evidenciada por el cambio de color de la tira a morado, debido a la reacción enzimática; sin embargo, en el caso de las BAL, el resultado es negativo y el viraje de color no se da (figura 52).



**Figura 51.** Procedimiento para la prueba de catalasa.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



**Figura 52.** Procedimiento para la prueba de oxidasa.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

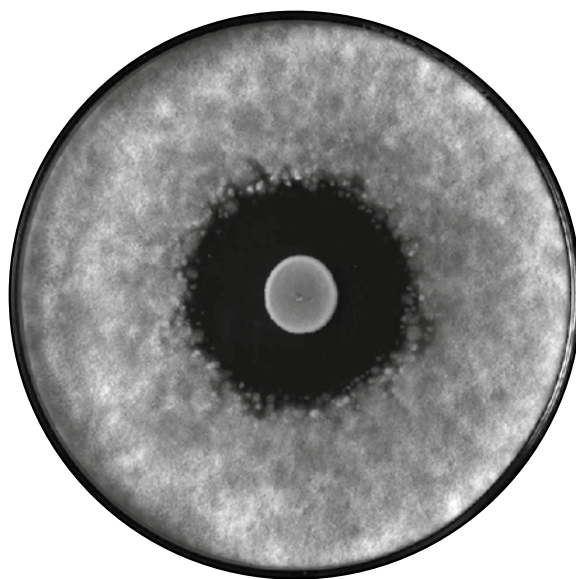
### Caracterización bioquímica

Son diversos los métodos comerciales de identificación bioquímica; sin embargo, el grupo de curadores de la colección realiza la caracterización bioquímica mediante el uso del kit API 50 CHL, que permite la identificación de *Lactobacillus* sp. y especies cercanas.

## Actividad biológica

La bioprospección de las BAL es una constante en la CMINA, ya que permite determinar la actividad antimicrobiana que puedan tener estas cepas frente a patógenos a nivel pecuario y agrícola. Para la determinación de esta habilidad, se utiliza la técnica *spot-on-lawn* (Hilal Cadirci & Citak, 2005), la cual consiste en la inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana o fúngica patógena mediante la producción de metabolitos extracelulares por parte de otro microorganismo antagonista.

A partir de cultivos de BAL en caldo MRS con 24 horas de crecimiento a  $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se inocula una microgota de  $10\text{ }\mu\text{L}$  en caja de Petri en agar selectivo y se deja secar durante media hora. Posteriormente, se incuba a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$  en jarra de anaerobiosis con sobres de anaerobiosis durante 24 horas. Después de la formación de colonias visibles, se añade agar PDA semisólido (0,85 %), para evaluar hongos, o agar BHI (*brain heart infusion*), para bacterias. A continuación, el medio semisólido se inocula con  $1 \times 10^4$  esporas/mL o con  $1 \times 10^8$  bacterias/mL. El agar semisólido se deja solidificar durante cinco minutos y se incuba con las condiciones y el tiempo determinados para cada microorganismo (bacterias:  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en microaerofilia; hongos:  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y levaduras:  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La actividad antagónica positiva se verifica por la formación de halos alrededor de la colonia de BAL con un diámetro mayor a 1 mm (figura 53).



**Figura 53.** Determinación de la actividad antagónica de BAL contra *Fusarium oxysporum* MAP5.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Grupo de bacterias anaerobias

Dentro de la CMINA se encuentra una colección de bacterias anaerobias que han sido aisladas de ensilajes de maíz y de avena; este grupo ha sido ampliamente estudiado y caracterizado mediante la tinción de Gram, la prueba de catalasa y oxidasa, el perfil bioquímico y su actividad biológica.

### Tinción de Gram

Las bacterias anaerobias ruminales de la CMINA son teñidas mediante coloración de Gram; sin embargo, en este caso se realiza una modificación propuesta por Spiegel (1991), denominada Kopeloff, que consiste, básicamente, en reemplazar la safranina por fucsina básica (figura 54).

### Montaje en fresco

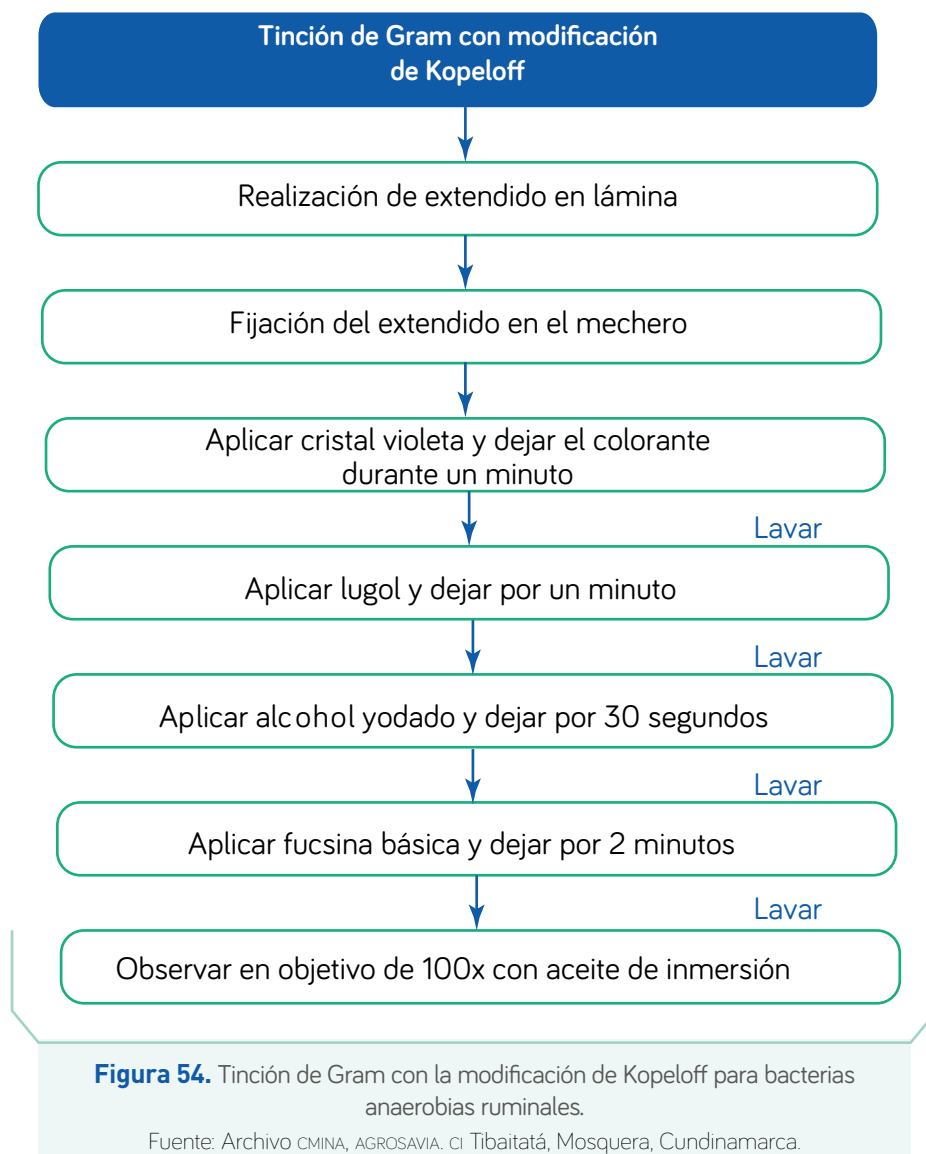
Una de las estrategias para la autenticación de microorganismos anaerobios ha sido la visualización de estos en un montaje en fresco; este montaje permite la diferenciación morfológica rápida en un microscopio de contraste de fases, además de la descripción de características únicas, como motilidad, presencia de flagelos y estructuras internas, u otras morfológicas que no son visibles al realizar montajes fijados, como las tinciones. Es importante que el montaje sea realizado en un microscopio de contraste de fases, ya que la luz refracta de diferente manera en cada una de las partes del microorganismo, lo que permite ver en detalle su composición (Montalvo Arenas, 2010).

### Caracterización bioquímica

En contraste con las BAL, la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias ruminales se realiza mediante el *kit* API® 20A, el cual permite la identificación de algunas especies de microorganismos del rumen de herbívoros silvestres. No obstante, esta metodología es limitada por el alcance de la base de datos para este grupo de microorganismos, pero sirve como fuente de información sobre la degradación de algunos sustratos.

### Crecimiento microbiano

Un aspecto clave en la conservación de microorganismos en una colección está asociado con la descripción del crecimiento de las cepas. El conocimiento de los tiempos de crecimiento, así como de otras variables —biomasa, velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación, entre otras—, permite conocer el estado de las células que se conservan, lo que garantiza

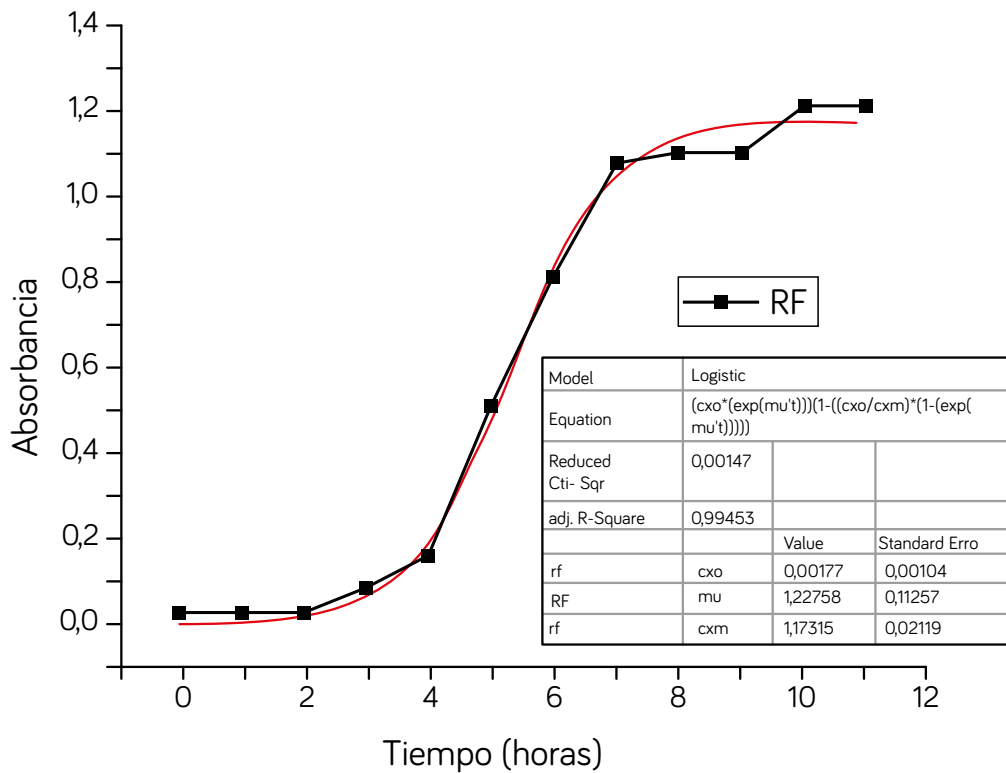


que se pueda tener un cultivo joven, con posibilidad de almacenamiento en el tiempo, sin afectar radicalmente la viabilidad, además de que facilita el diseño de experimentos y la manipulación de los microorganismos.

Para la determinación del crecimiento de las bacterias anaerobias ruminales, el crecimiento se lleva a cabo en un medio anaerobio específico para el microorganismo (tabla 8). Inicialmente, las bacterias son reactivadas poniendo los criotubos en un baño serológico a  $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente se inocula 1 mL del contenido del criotubo en 9 mL del medio de crecimiento para

bacterias anaerobias. Finalizado el tiempo de incubación, se realiza una nueva siembra a partir del tubo con crecimiento: se inoculan 0,3 mL en 30 mL del caldo anaerobio, y se cuantifica su crecimiento mediante absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, utilizando un espectrofotómetro, en intervalos de una hora hasta alcanzar la fase estacionaria.

Para el análisis de los datos obtenidos, se emplea un modelo de tipo no estructurado y no segregado (Garcia-Ochoa & Santos, 1994). Este modelo permite describir el incremento de la biomasa en el tiempo, además de que se ajusta de acuerdo con el comportamiento de cada bacteria respecto de los datos experimentales recolectados en el tiempo (figura 55). Para esto, se emplea la ecuación logística, que está ajustada a los parámetros necesarios.



**Figura 55.** Evaluación de crecimiento de una cepa de la CMINA.  
Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Caracterización molecular

En la CMINA, la caracterización molecular es un paso fundamental para la caracterización y autenticación de las accesiones, y para realizarla se ha utilizado la identificación del gen 16S rARN, con los *primers universales* 27F (5'AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTACGACTT3') (Chen et al., 2015), como identificación general para todas las bacterias del banco; sin embargo, también se han utilizado *primers* específicos para identificación de microorganismos anaerobios ruminales (tabla 9).

Estos *primers* sirven para la detección específica y la cuantificación de dichos microorganismos mediante RT-PCR.

**Tabla 9.** Listado de *primers* utilizados para la identificación de bacterias anaerobias ruminales.

Microorganismo	Cepa de referencia	Primer	
		Forward	Reverse
<i>Prevotella ruminicola</i>	ATCC 19189 <sup>T</sup>	GGTTATCTTGAGTGAGTT	CTGATGGCAACTAAAGAA
<i>Prevotella bryantii</i>	B,4 <sup>T</sup>	ACTGCAGCGCGAACTGTCAGA	ACCTTACGGTGGCAGTGTCTC
<i>Prevotella albensis</i>	M384 <sup>T</sup>	CAGACGGCATCAGACGAGGAG	ATGCAGCACCTTCACAGGAGC
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	ATCC 19169 <sup>T</sup>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	ATCC 29744 <sup>T</sup>	CAACCAGTCGCATTCAGA	CACTACTCATGGCAACAT
<i>Selenomonas ruminantium</i> o <i>Mitsuokella multiacida</i>	JCM 6582 <sup>T</sup>	TGCTAATACCGAATGTTG	TCCTGCACTCAAGAAAGA
<i>Streptococcus bovis</i>	JCM 5802 <sup>T</sup>	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG
<i>Treponema bryantii</i>	ATCC 33254 <sup>T</sup>	AGTCGAGCGGTAAGATTG	CAAAGCGTTTCTCTCACT
<i>Eubacterium ruminantium</i>	ATCC 17233 <sup>T</sup>	GCTTCTGAAGAATCATTGAAG	TCGTGCCTCAGTGTCAAGTGT
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	ATCC 33276 <sup>T</sup>	TGGGTGTTAGAAATGGATTC	CTCTCCTGCACTCAAGAATT
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	ATCC 19716 <sup>T</sup>	TGGGAAGCTACCTGATAGAG	CCTTCAGAGAGGTTCTCACT
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	ATCC 19208 <sup>T</sup>	GGACGATAATGACGGTACTT	GCAATCYGAACTGGGACAAT

Fuente: Tajima et al. (2001)

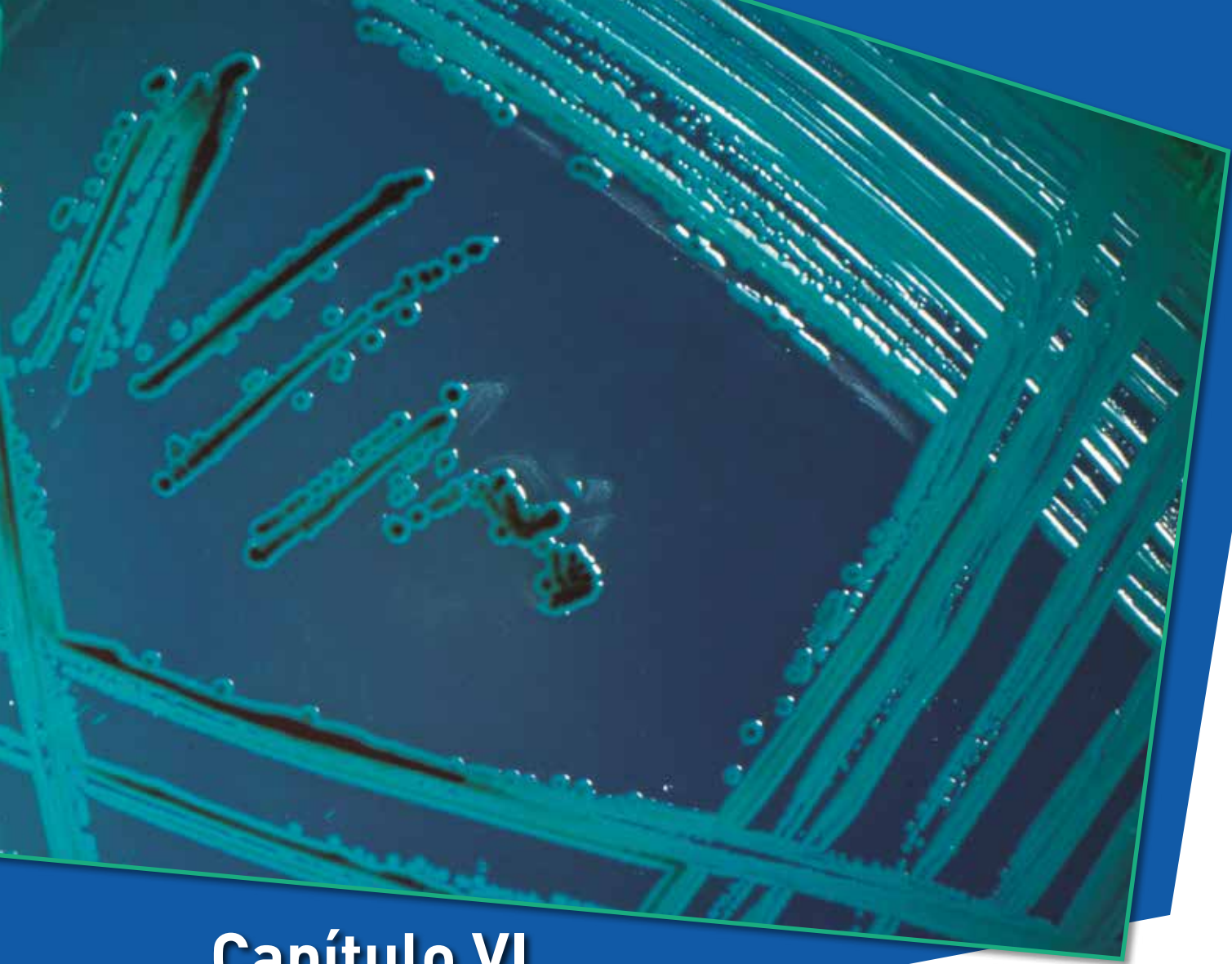
## Referencias

- Akin, D. E., & Borneman, W. S. (1990). Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3.023-3.032. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78989-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78989-8)
- Archibald, F. S., & Fridovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 146(3), 928-936. <https://doi.org/10.1128/jb.146.3.928-936.1981>
- Ariyapitipun, T., Mustapha, A., & Clarke, A. D. (1999). Microbial shelf life determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin solutions. *Journal of Food Protection*, 62(8), 913-920. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.8.913>
- Bryant, M. P., & Burkey, L. A. (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*, 36(3), 205-217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(53\)91482-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(53)91482-9)
- Cammack, K. M., Austin, K. J., Lamberson, W. R., Conant, G. C., & Cunningham, H. C. (2018). Ruminnat nutrition symposium: Tiny but mighty: the role of the rumen microbes in livestock production. *Journal of Animal Science*, 96(2), 752-770. <https://doi.org/10.1093/jas/skx053>
- Chen, Y.-L., Lee, C.-C., Lin, Y.-L., Yin, K.-M., Ho, C.-L., & Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18), artículo S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>
- Cox, M. E., & Mangels, J. I. (1976). Improved chamber for the isolation of anaerobic microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(1), 40-45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274386/>
- Dehority, B. A. (2002). Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 145-160. <https://doi.org/10.1080/09712119.2002.9706367>
- Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *fems Microbiology Ecology*, 58(3), 572-582. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>
- Domingues Millen, D., De Beni Arrigoni, M., & Dias Lauritano Pacheco, R. (eds.). (2016). *Rumenology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2>
- Drinan, D. F., Tobin, S., & Cogan, T. M. (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 481-486. <https://doi.org/10.1128/aem.31.4.481-486.1976>
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J., & Wallace, R. J. (2004). 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(3), 263-281. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000047942.69033.24>

- Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J., & Nelson, K. E. (2012). Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS ONE*, 7(11), artículo e48289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048289>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of cheese science* (2.ª ed.). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Freire, J. R. (1999). Conservación de cultivos de rhizobios. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(1), 35-45.
- García-Ochoa, F., & Santos, V. E. (1994). Revisión cinética de transformaciones usando microorganismos: modelos cinéticos no estructurados. *Anales de Química*, 90, 7-17.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*. ASM Press.
- Giassi, V., Kiritani, C., & Kupper, K. C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>
- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Fliegerova, K., Griffith, G. W., Forster, R., Tsang, A., McAllister, T., & Elshahed, M. S. (2014). Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12383>
- Hassan, A. N., & Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. En E. H. Marth, & J. Steele (eds.), *Applied dairy microbiology* (2.ª ed., pp. 151-206). CRC Press.
- Hilal Cadirci, B., & Citak, S. (2005). A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4), 237-241. <https://doi.org/10.3923/pjn.2005.237.241>
- Hofmann, R. R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: A comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78(4), 443-457. <https://doi.org/10.1007/BF00378733>
- Hungate, R. E. (1957). Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Canadian Journal of Microbiology*, 3(2), 289-311. <https://doi.org/10.1139/m57-034>
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En J. R. Norris, & D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology* (vol. 3, parte B, pp. 117-132). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8)
- Jami, E., White, B. A., & Mizrahi, I. (2014). Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS ONE*, 9(1), artículo e85423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085423>
- Joshi, A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., & Dagar, S. S. (2018). *Liebertanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from the rumen of a goat. *MycKeys*, 40, 89-110. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.40.28337>

- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., & McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 663-693. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
- McSweeney, C. S., Blackall, L. L., Collins, E., Conlan, L. L., Webb, R. I., Denman, S. E., & Krause, D. O. (2005). Enrichment, isolation and characterisation of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1-2), 191-204. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.018>
- Montalvo Arenas, C. E. (2010). *Microscopía*. [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/2\\_microscopia.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf)
- Morales, F., Morales, J. I., Hernández, C. H., & Hernández-Sánchez, H. (2011). Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6), 889-905. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9182-6>
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. En L. Trugo, & P. M. Finglas (eds.), *Encyclopedia of food science and nutrition* (2.<sup>a</sup> ed., pp. 3.465-3.472). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., & Pang, H. (2015). Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS ONE*, 10(3), artículo e0121967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121967>
- Orpin, C. G. (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 91(2), 249-262. <https://doi.org/10.1099/00221287-91-2-249>
- Parada, J. L., De Caire, G. Z., de Mulé, M. C. Z., & De Cano, M. M. S. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3), 225-228. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00151-2)
- Puniya, A. K., Singh, R., & Kamra, D. N. (2015). *Rumen microbiology: From evolution to revolution*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3>
- Rezaeian, M., Beakes, G. W., & Parker, D. S. (2004). Methods for the isolation, culture and assessment of the status of anaerobic rumen chytrids in both *in vitro* and *in vivo* systems. *Mycological Research*, 108(10), 1.215-1.226. <https://doi.org/10.1017/S0953756204000917>
- Rodríguez, F., Martín, E., Laverde, C., Mayorga, O. L., Carvajal, F., Rodríguez, T. A., & Rodríguez, J. A. (eds.). (2011). *Manual de laboratorio para el estudio de microorganismos anaerobios obligados*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13270/73338\\_58163.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13270/73338_58163.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Sánchez Leal, L. C., & Corrales Ramírez, L. C. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3), 109-113. <https://doi.org/10.22490/24629448.23>

- Scott, R. I., Yarlett, N., Hillman, K., Williams, A. G., Lloyd, D., & Williams, T. N. (1983). The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. *Journal of Applied Bacteriology*, 55(1), 143-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02658.x>
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Spiegel, C. A. (1991). Bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(4), 485-502. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.4.485>
- Stanley, G. (1998). Cheeses. En J. B. Wood (ed.), *Microbiology of fermented foods* (2.<sup>a</sup> ed., vol. 1, pp. 263-307). Blackie Academic & Professional.
- Stiles, M. E., & Holzapel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2766-2774. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt: Science and technology*. Elsevier.
- Theodorou, M. K., & France, J. (2005). Rumen microorganisms and their interactions. En J. Dijkstra, J. M. Forbes, & J. France (eds.), *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (2.<sup>a</sup> ed., pp. 207-228). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851998145.0207>
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2.<sup>a</sup> ed.). Cornell University Press. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.32-4505>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Windham, W. R., & Akin, D. E. (1984). Rumen fungi and forage fiber degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), 473-476. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.3.473-476.1984>
- Wubah, D. A., & Kim, D. S. H. (1996). Chemoattraction of anaerobic ruminal fungi zoospores to selected phenolic acids. *Microbiological Research*, 151(3), 257-262. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80022-X](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80022-X)
- Xue, M., Sun, H., Wu, X., Guan, L. L., & Liu, J. (2018). Assessment of rumen microbiota from a large dairy cattle cohort reveals the pan and core bacteriomes contributing to varied phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, artículo e00970-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00970-18>
- Zamora Rodríguez, L. M. (2003). *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero* [tesis doctoral, Universidad de Girona]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/Tlzt.pdf;jsessionid=E753D716FF66DD25AA91BAOC211C598B?sequence=4>



## Capítulo VI

*Salmonella* sp. en agar entérico Hektoen, CMISA ↑

164

### **Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)**

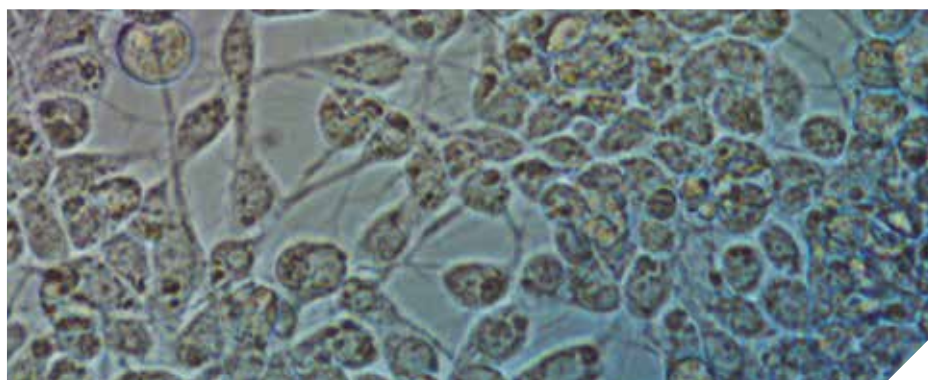
Ligia Denise Torres Higuera  
Sabrina del Carmen Jiménez Velásquez  
David Emigdio López Ardila  
Óscar Gabriel Beltrán  
María Camila Rengifo Ibáñez

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Autora de correspondencia: María Camila Rengifo Ibáñez; correo electrónico: [mrenjifo@agrosavia.co](mailto:mrenjifo@agrosavia.co)

En nuestro país, los sistemas de producción animal están amenazados por la presencia de microorganismos patógenos causantes de enfermedades bacterianas como leptospirosis, mastitis, brucelosis, salmonelosis, enfermedad de Newcastle y enfermedades producidas por hemoparásitos, como anaplasmosis, babesiosis y tripanosomiasis. Estas patologías ocasionan pérdidas económicas importantes asociadas con la incidencia de casos de abortos, infertilidad, anemia, emaciación y cuadros febriles, entre otros signos clínicos que provocan disminución en la calidad de la leche, la carne y demás subproductos, así como también la presencia de animales persistentemente infectados, la aparición de residuos antimicrobianos en alimentos, la generación de resistencia antimicrobiana y la muerte de grupos de animales (Adler & De la Peña Moctezuma, 2010; Balamurugan et al., 2013).

En 2015, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2015, 2016), por medio de la Resolución 3714, ratificó la importancia de la mayoría de estas enfermedades, mediante su inclusión en la lista de enfermedades de reporte oficial, dado su papel en el proceso de diagnóstico diferencial con otros agentes de origen infeccioso; en 2016, el ICA reportó en su boletín epidemiológico anual que, del total de predios bovinos afectados ese año, el 99,69 % correspondió a enfermedades infecciosas, y, de allí, el 20,19 % correspondió a infecciones bacterianas, y el 6,87 %, a enfermedades hemoparasitarias.

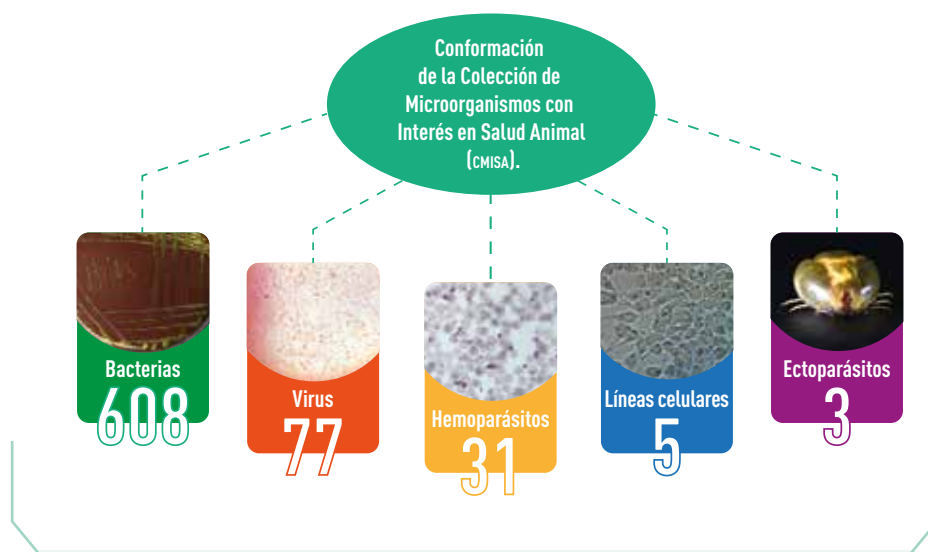
Por esto, el estudio de la diversidad biológica presente en la CMISA proporciona conocimiento fundamental para la elaboración de estrategias de prevención encaminadas al mejoramiento de los sistemas de producción pecuaria colombianos. La CMISA ha sido conformada con cepas de referencia y aislamientos, por medio de colectas realizadas en diferentes departamentos del territorio colombiano, con el objetivo de contar con material biológico que pueda ser utilizado en diversos trabajos de investigación y para el desarrollo de productos biotecnológicos como inmunógenos experimentales o comerciales, pruebas de diagnóstico



Línea celular de garrapata ISE6 *Ixodes scapularis*, CMISA ↑

y estudios epidemiológicos. Dentro de las colecciones de microorganismos encontramos la colección de bacterias-virus y de ectoparásitos-hemoparásitos, cuya viabilidad, pureza y actividad biológica son año tras año objeto de actividades de monitoreo. Los resultados obtenidos permiten no solo evaluar la eficacia de los métodos de conservación vigentes, sino también depurar las colecciones.

La colección de bacterias y virus está compuesta por 608 accesiones bacterianas, representadas por 85 cepas de *Leptospira*, 385 de *Staphylococcus*, 68 de *Streptococcus*, 17 de *Brucella abortus*, 39 bacterias ácido-lácticas (BAL), 7 cepas de *Escherichia coli* O157:H7, 7 de *Salmonella*, 57 de virus de Newcastle y 20 de estomatitis vesicular. Adicionalmente, se cuenta con tres líneas celulares, entre las que se encuentran las células Vero, las células BHK-21 y las células HeLa, para la evaluación de viabilidad de cepas virales y otros ensayos *in vitro*. Por su parte, la colección de ectoparásitos y hemoparásitos se compone de 31 cepas de hemoparásitos, entre las cuales se encuentran 11 accesiones de *Anaplasma marginale*, 5 cepas de *Babesia bovis*, 8 cepas de *Babesia bigemina*, 5 cepas de *Trypanosoma vivax*, una cepa de *Trypanosoma theileri*, una cepa de *Trypanosoma evansi* y 3 colonias de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de nombre Porto Alegre, Montecitos y Palma de Vino. Además, recientemente se adquirieron las líneas celulares de la garrapata IDE8-ISE6, del género *Ixodes* (figura 56).



**Figura 56.** Conformación de la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA).

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Métodos de conservación empleados en la CMISA

La CMISA emplea dos grandes métodos para conservar sus accesiones microbianas: congelación y liofilización. Los apartados siguientes describen las particularidades de estos métodos para los diferentes grupos microbianos conservados en la colección.

### Congelación

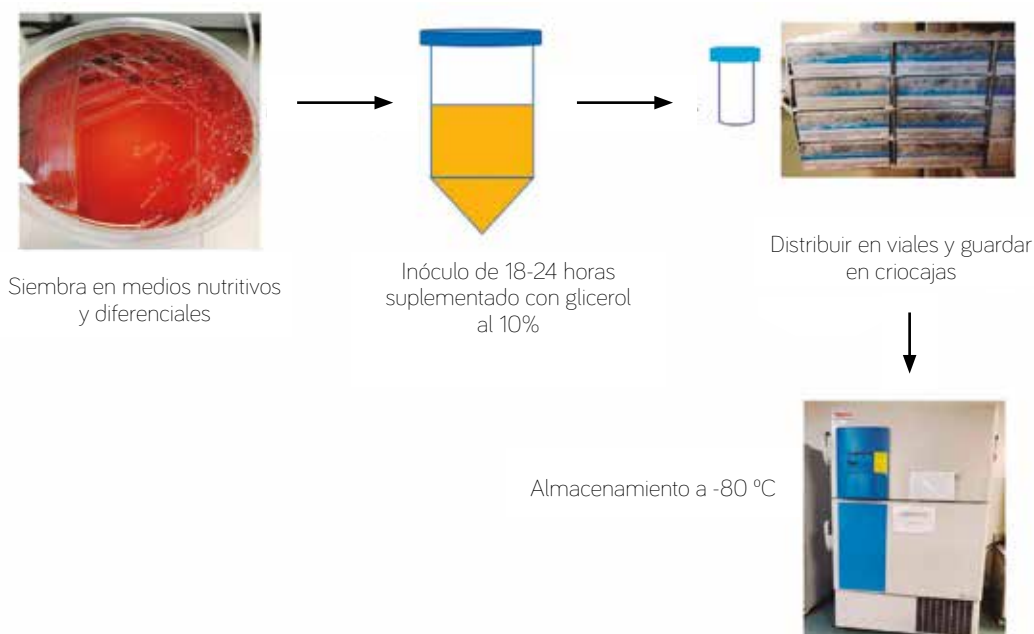
La congelación es utilizada en la CMISA como método de conservación para bacterias en general, para bacterias del género *Leptospira*, para accesiones virales y para la colección de hemoparásitos.

### Congelación de accesiones bacterianas

En la CMISA, tanto microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos son conservados a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta conservación se realiza a partir de cultivos obtenidos en medios enriquecidos comerciales, como agar sangre (composición en g/L: peptona especial: 23; almidón: 1; NaCl: 5, y agar: 10, suplementado con glóbulos rojos de sangre de cordero desfibrinada estéril al 5 % [v/v]), el cual proporciona los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de varios microorganismos. La adición de sangre de cordero desfibrinada estéril al 5 % promueve el desarrollo de bacterias exigentes y permite evidenciar la capacidad hemolítica expresada por algunas especies microbianas. Algunas de las bacterias de la colección, como *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli* y *Streptococcus*, son sembradas por agotamiento y llevadas a incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. El agar sangre también se utiliza para cepas de *Brucella abortus*, pero se incuba en condiciones de microaerofilia para su crecimiento. Todos los procedimientos con *B. abortus* se realizan en cabina de bioseguridad A2B2, por ser un microorganismo con nivel de bioseguridad tipo 3. Después del crecimiento en agar sangre, y una vez confirmada la pureza por morfología macro y microscópica, las bacterias son repicadas en agar BHI (a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas), para su posterior conservación. A partir del crecimiento en agar BHI, se realiza un recuento en cámara de Neubauer para ajustar la concentración a  $1 \times 10^8$  en caldo BHI, y se lleva a incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre 16 y 24 horas, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía o hasta el inicio de la fase estacionaria, dependiendo del microorganismo. Una vez terminado el tiempo de incubación, al cultivo con crecimiento se le adiciona glicerol estéril ajustando la concentración final entre el 10 y el 12 %.

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

Esta misma metodología se utiliza para la conservación de cepas de *Lactobacillus*, pero el medio de reactivación y congelación es el MRS, medio comercial desarrollado para el crecimiento específico de este microorganismo y otras BAL; además, debe generarse una atmósfera anaerobia para su cultivo. Todos los cultivos son distribuidos en crioviales y debidamente marcados con el nombre del microorganismo, el código de la accesión y la fecha de conservación; asimismo, los viales son conservados en criocajas dispuestas para tal fin (figura 57).



168

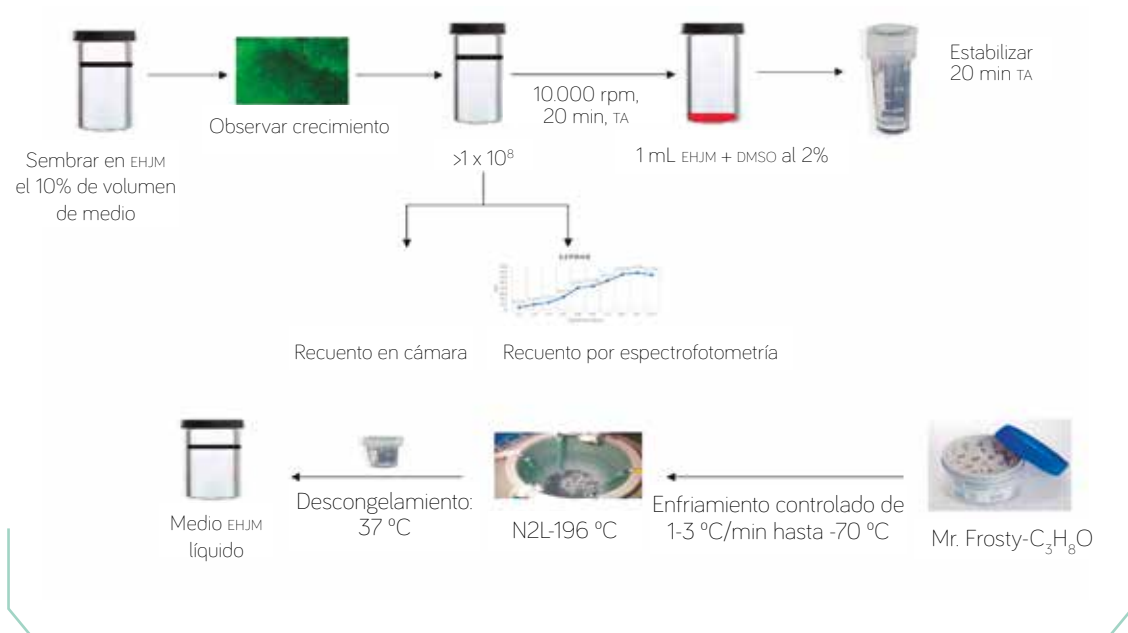
**Figura 57.** Flujo de trabajo de criopreservación a -80 °C para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

### Congelación de accesiones del género *Leptospira*

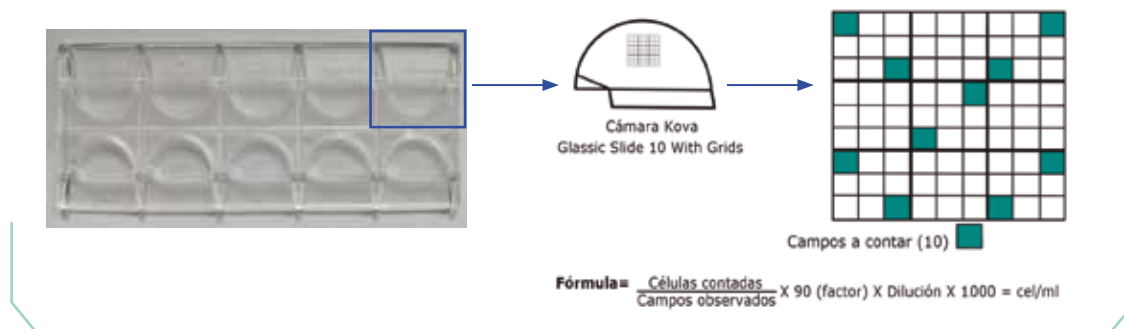
El grupo de bacterias del género *Leptospira* se conserva a largo plazo en nitrógeno líquido a -196 °C, empleando caldo EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) más dimetilsulfóxido (DMSO) al 2 %, a un ritmo de congelación controlado de 1 °C/minuto, durante cuatro horas, hasta -70 °C. El medio sintético EMJH está compuesto por albúmina sérica bovina, polisorbato (como fuente de carbono), piruvato de sodio, glicerol, tiamina HCL (B1),

cianocobalamina (B12), cloruro de amonio, sulfato de zinc, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de sodio y sulfato ferroso, suplementado con suero de conejo al 1 % (v/v) (González et al., 2006; González Rodríguez et al., 2003; Philip et al., 2018). Como la edad del cultivo y la cantidad de microorganismos son factores críticos en la crioconservación, generalmente se toman cultivos en la fase exponencial de crecimiento. Por esta razón, previo a la crioconservación del microorganismo, se determina la cinética de crecimiento mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 400 nm cada 24 horas durante 4-5 días, tomando muestras asepticamente. La concentración de *Leptospira* en los cultivos, antes y después de la congelación en nitrógeno líquido, se establece mediante recuento por microscopía de campo oscuro, usando una cámara de recuento con profundidad especial (figuras 58 y 59) (Philip et al., 2018; Prakash et al., 2013; Torres Higuera et al., 2008).



**Figura 58.** Crioconservación de cepas de *Leptospira* en nitrógeno líquido, a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en medio EMJM, con 2 % de dimetilsulfóxido (DMSO).

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



**Figura 59.** Recuento de *Leptospira* por microscopía de campo oscuro con la cámara de recuento con profundidad especial.

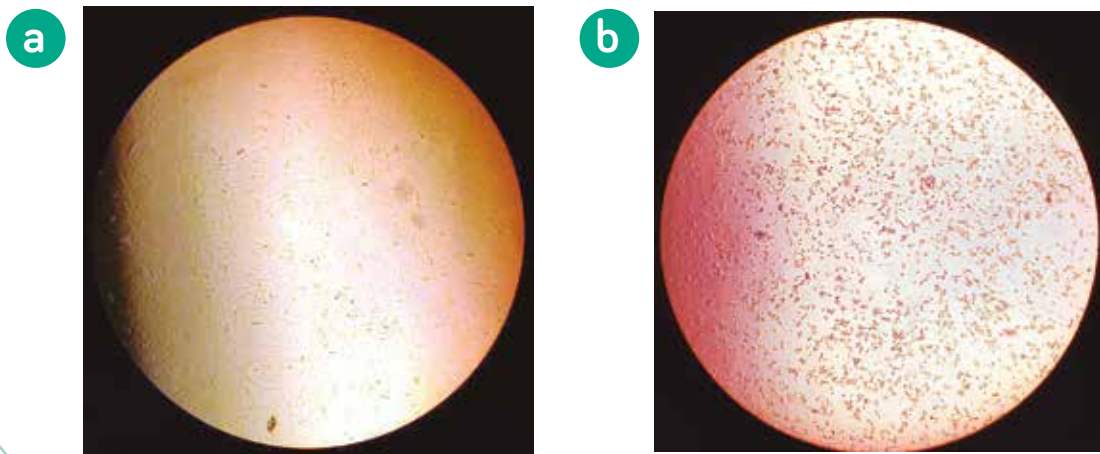
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Congelación de accesiones virales

En la colección de virus se encuentra conservado el virus de la enfermedad de Newcastle, compuesto por 2 cepas de referencia y 55 aislamientos clasificados a la fecha de acuerdo con su grado de virulencia (velogénicos, mesogénicos y lentogénicos), su índice de hemaglutinación y su índice de mortalidad embrionaria, intravenosa e intracerebral (Bustos, 1999; Bustos & Marín, 1995; Villacís Rivas et al., 2014). Estos aislamientos han sido obtenidos en diferentes departamentos (Antioquia, Boyacá, Córdoba, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Cundinamarca, Santander, Valle del Cauca, Caldas y Risaralda) y de diferentes orígenes biológicos (insectos, materia fecal de ratón y cerdo y muestras de aves comerciales y silvestres). Asimismo, la colección cuenta con el virus de estomatitis vesicular, compuesto por 20 aislamientos procedentes de diferentes departamentos del país y aislados a partir de tejido sublingual.

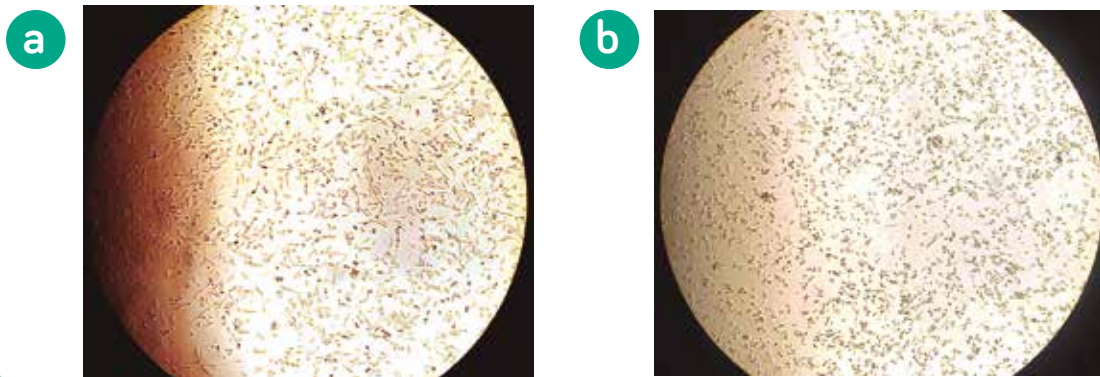
Para evaluar la viabilidad de las accesiones virales de Newcastle y del virus de estomatitis vesicular, inicialmente se debe establecer en cultivo la línea celular Vero (células epiteliales del riñón de un mono verde africano) o BHK-21 (fibroblasto de riñón de hámster bebé), respectivamente, en el medio mínimo esencial (MEM, por sus siglas en inglés), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, hasta obtener una monocapa con una confluencia del 90 %. Esta monocapa es utilizada tanto para la infección viral como para la congelación de un nuevo pase de esta línea celular. Una vez establecido el cultivo celular, se efectúa la adaptación del virus en la célula respectiva, con el fin de establecer el efecto citopático (ECP) (desprendimiento de la monocapa celular y formación de sincitios) (figuras 60 y 61).

Las cajas de cultivo celular inoculadas con el virus de Newcastle se incuban a 37 °C y al 5 % de CO<sub>2</sub> por 72 horas, hasta observar el ECP; luego, las células infectadas se someten a choque térmico por congelación y descongelación, con el fin de liberar las partículas virales. El contenido del cultivo es centrifugado, y el sobrenadante es distribuido en crioviales y almacenado a -70 °C o en nitrógeno líquido a -196 °C. La nueva generación celular de las líneas celulares es almacenada en nitrógeno líquido a -196 °C, con DMSO al 5 % como crioprotector (Ravindra et al., 2009; Villacís Rivas et al., 2014).



**Figura 60.** Microfotografía del efecto citopático (ECP) observado en la línea celular Vero. **a.** Células Vero sin infectar; **b.** Células Vero ATCC, pase 3-2017, con ECP provocado por VNC030 a las 48 horas de incubación en el primer pase.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



**Figura 61.** Microfotografía del ECP observado en la línea celular BHK-21. **a.** Células BHK-21 sin infectar; **b.** Células BHK-21 con ECP provocado por COL-VEV-010 a las 24 horas de incubación en el segundo pase.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Congelación de accesiones de hemoparásitos

Por su parte, el grupo de hemoparásitos está conformado por accesiones de protozoos y rickettsias de importancia en Colombia aisladas de diferentes regiones del país a partir de sangre infectada, principalmente, o de garrapatas, en el caso de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. Las accesiones de esta colección se encuentran caracterizadas, clínicamente, de acuerdo con las alteraciones hematológicas que producen y, molecularmente, por medio de marcadores específicos reportados para estos géneros.

Una de las actividades para el mantenimiento de las cepas de la colección es la evaluación de su viabilidad cada cinco años. Para la evaluación de viabilidad, es preciso realizar la reactivación de la cepa en semovientes experimentales, proceso que también permite la obtención de sangre infectada, que es crioconservada a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de acuerdo con el proceso que se describe a continuación:

- Una vez confirmada la infección, se colecta una muestra de sangre en bolsa de transfusión, o en tubos con EDTA, en caso de ser sangre infectada con *Trypanosoma* sp.
- En el laboratorio y en cabina de bioseguridad, se reparte de manera proporcional la sangre en tubos cónicos plásticos. Las alícuotas se centrifugan para recuperar el paquete de glóbulos rojos, y tanto el suero como los glóbulos blancos se descartan.
- Al *pellet* de glóbulos rojos se le agrega *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) en una proporción de 1:1, se mezcla bien y se centrifuga, tras lo cual se descartan, nuevamente, el suero y los glóbulos blancos. Este paso se realiza dos veces más.
- Para el caso de *Babesia* y *Anaplasma*, el *pellet* de glóbulos rojos obtenido se suspende nuevamente en PBS, en proporción de 1:1, para ajustar el hematocrito hasta el 30 %. De la solución resultante, se dispensan 900  $\mu\text{L}$  en crioviales y se agregan 900  $\mu\text{L}$  de crioprotectante glicerol glucosa al 10 %, se tapan los crioviales, se mezclan suavemente y se almacenan directamente a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nota: Para crioconservar *Trypanosoma* spp., el resultado en observación microscópica debe ser de (+++) a la prueba de Woo (1969), es decir,  $>100$  tryps (utilizar heparina como anticoagulante). La muestra de sangre completa no

debe ser lavada en PBS, pues se mezcla directamente con el crioprotectante en crioviales y se almacena a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Liofilización

En la colección de bacterias se utiliza una mezcla de crioprotectantes para bacterias Gram-positivas: leche descremada al 10 % + glutamato sódico al 1 % (LG). Los microorganismos Gram-positivos, como *Staphylococcus*, tienen una mayor tasa de supervivencia a la liofilización, probablemente debido al espesor del peptidoglicano, componente principal de la pared celular bacteriana, lo cual los hace más resistentes a la desecación y rehidratación durante la liofilización (Miyamoto-Shinohara et al., 2006; Romaniuk & Cegelski, 2015). Para microorganismos Gram-negativos, como *Salmonella* y *E. coli*, se emplea como crioprotectante una mezcla de sacarosa al 10 % + gelatina al 1 % (SG), una temperatura de almacenamiento del líofilo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el medio de crecimiento del microorganismo, para la rehidratación del líofilo (Barragán Cárdenas & Lesmes Hernández, 2009).

El protocolo de liofilización inicia con la reactivación de las cepas mantenidas en congelación en agar sangre y con su incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. A partir del crecimiento, se realiza una evaluación morfológica por tinción de Gram para confirmar pureza de cultivos. En la preparación del inóculo, se emplean cultivos frescos en agar BHI y se ajusta una concentración celular en solución salina mediante conteo en cámara de Neubauer, para determinar el número de células/mL. A partir del inóculo ajustado en solución salina, se determina el volumen que se debe agregar en la mezcla de los crioprotectantes (LG o SG) para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  bacterias/mL. Finalmente, las ampollas son llenadas con 0,5 mL de la suspensión bacteriana en la mezcla de los crioprotectantes y llevadas a congelación, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas, para su posterior liofilización, por 24 horas, hasta completar



*Staphylococcus aureus* ↑  
en agar DNasa, CMISA

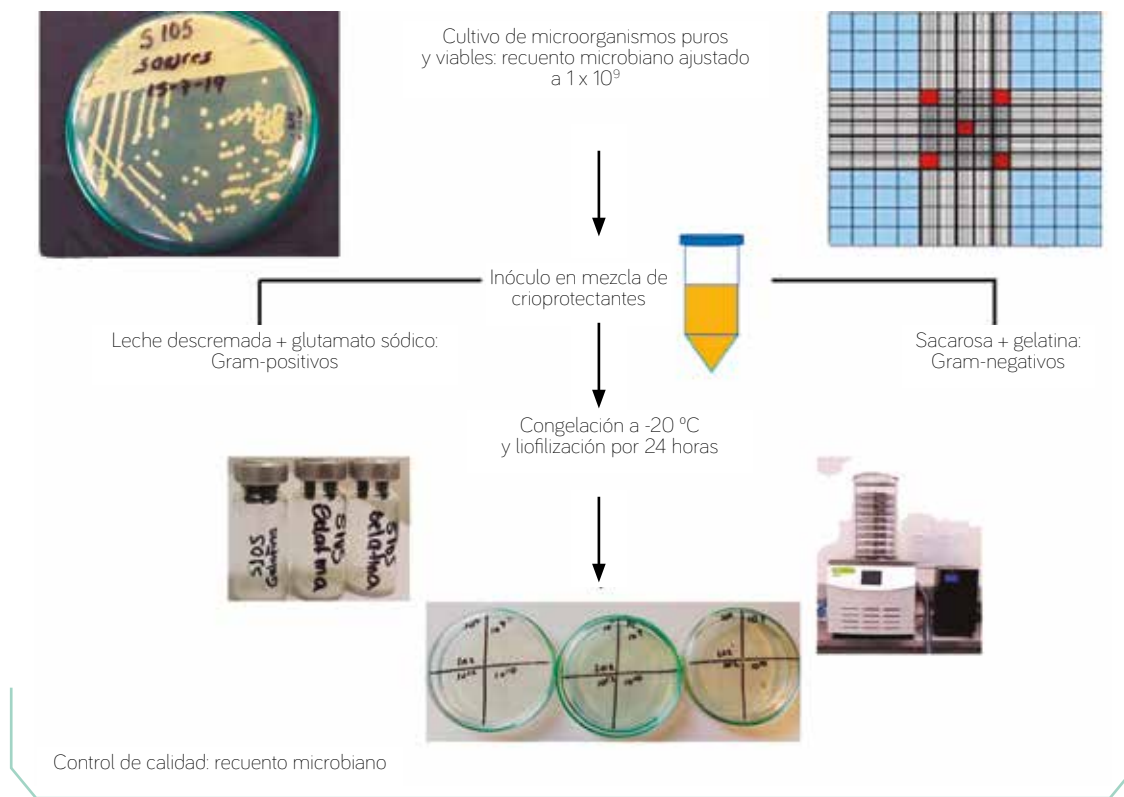
la sublimación (Portner et al., 2007). También se realiza un control de calidad de las cepas liofilizadas para determinar su tasa de viabilidad. Para esto, se toman tres ampollas, se resuspenden con 0,5 mL de caldo BHI y se mantienen a temperatura ambiente por 20 minutos. Después, se realiza un recuento bacteriano en placa, mediante diluciones seriadas en base 10 en solución salina, y se siembran 10  $\mu$ L de las diluciones más altas en el medio *plate count* por triplicado, incubadas a 37 °C por 18 horas (figura 62) (Zhao & Zhang, 2005). Los datos de los recuentos bacterianos son transformados en logaritmos, para determinar el porcentaje de bacterias viables (Lu et al., 2017; Stephan et al., 2016), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Células viables antes de liofilización} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right)}{\text{Células viables liofilizadas (UFC)/mL}} * 100$$

Es una buena estrategia utilizar mezclas de crioprotectantes que incluyen disacáridos, leche descremada y compuestos proteicos, pues pueden proteger a las células durante el proceso de liofilización (Han et al., 2018; Kupletskaya & Netrusov, 2011; Lu et al., 2017; Polo et al., 2017; Stefanello et al., 2018; Zhang et al., 2016). En el seguimiento de la viabilidad de las cepas liofilizadas se ha encontrado una tasa de supervivencia del 100 %; sin embargo, las mezclas de crioprotectantes y las condiciones de almacenamiento dependen de cada microorganismo, por lo que cualquier método nuevo de conservación que se implemente debe ser evaluado en el tiempo para determinar la viabilidad de las cepas.



*Lactobacillus* sp., tinción de Gram, CMISA ↑



**Figura 62.** Flujo de trabajo de liofilización para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Conservación por siembra en intervalos

En la CMISA, esta conservación es utilizada en el género *Leptospira* y en líneas celulares. A continuación se describen los métodos mencionados.

### Conservación del género *Leptospira*

Los aislamientos de *Leptospira* generalmente se mantienen en el laboratorio mediante subcultivos periódicos, a temperatura ambiente, en medio líquido o semisólido EMJH o en medios de enriquecimiento con ácidos grasos de cadena larga y suero de conejo. El medio semisólido permite un crecimiento estable del microorganismo, evidenciado en una zona densa de crecimiento conocida como “anillo de Dinger”, después de aproximadamente 8-10 días de incubación a  $29\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 63); en este medio, las cepas se conservan por aproximadamente un año. En el medio líquido, los cultivos son menos estables, por lo que necesitan ser monitoreados con mayor frecuencia que en el medio semisólido, razón por la cual este último es considerado el medio de

**Capítulo VI.** Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA)  
(bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

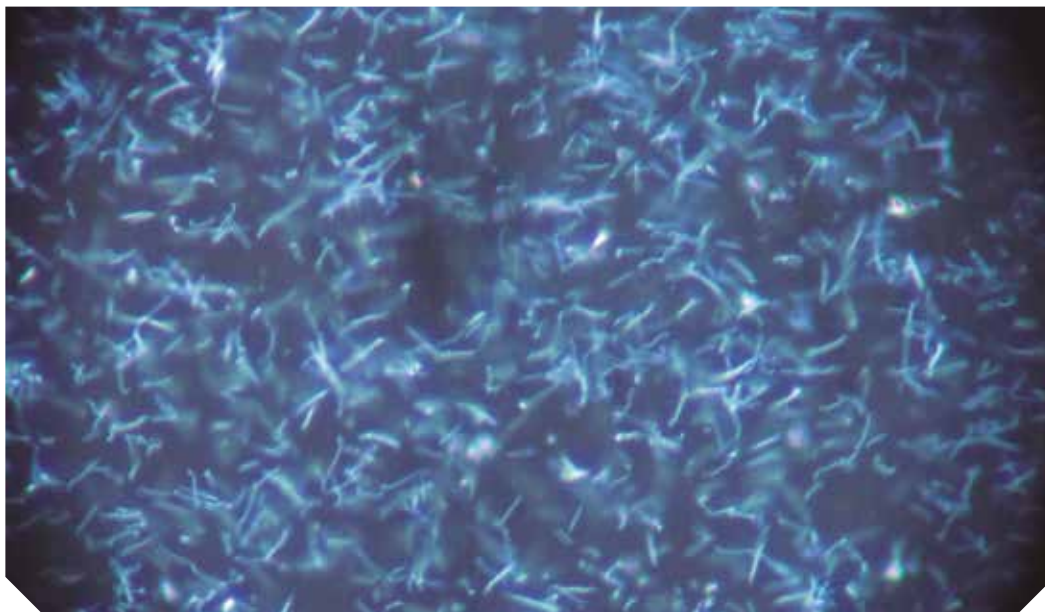


**Figura 63.** Crecimiento de cepas de *Leptospira* en medio semisólido EMJH y anillo de Dinger.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

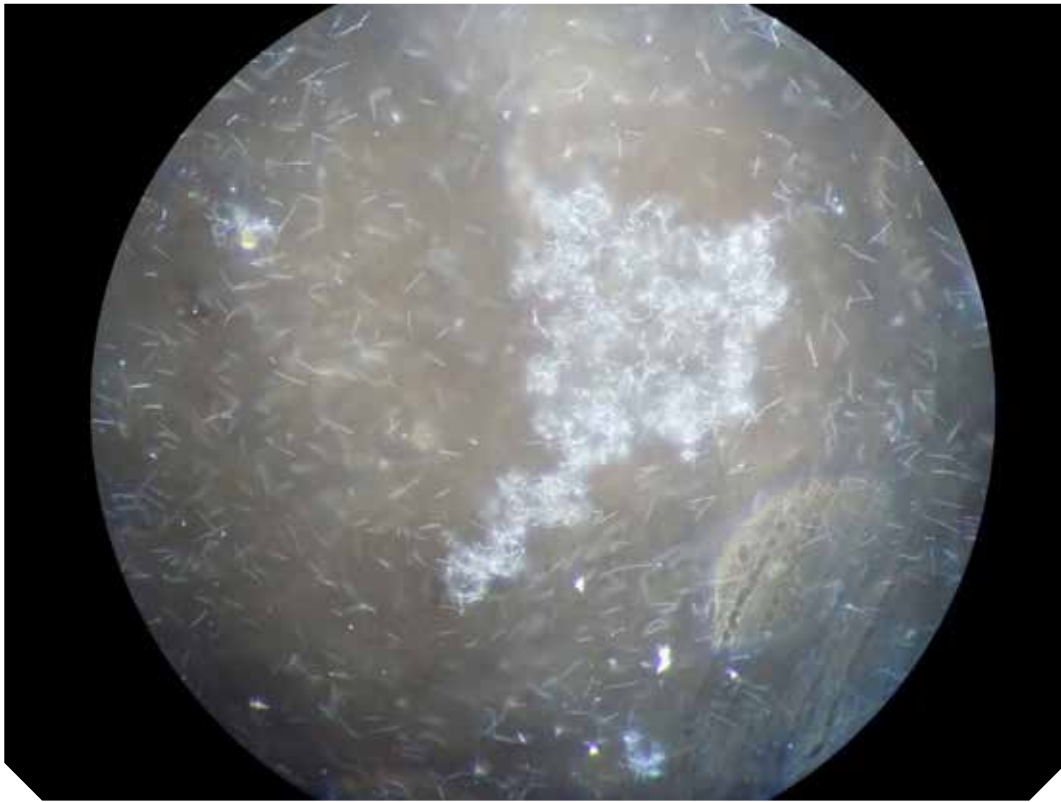
mantenimiento por excelencia para cepas de *Leptospira* (Cameron, 2015; Nally et al., 2018; Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2019; Philip et al., 2018; Zuerner, 2005).

*Leptospira* es la más pequeña de todas las espiroquetas (0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 6-20  $\mu\text{m}$  de longitud) y tiene una morfología muy delgada, por lo que su visualización en montajes frescos, bajo microscopía de luz, es imposible; por lo tanto, la observación de cultivos vivos en suspensión requiere de microscopía de campo oscuro (figuras 64 y 65). Cultivos puros con buena motilidad y uniformidad celular se consideran apropiados para sembrar en medio de mantenimiento semisólido EMJH, a 30 °C, por 10 días, para su conservación a temperatura ambiente y en oscuridad (Adler & De la Peña Moctezuma, 2010; Levett, 2001; Nally et al., 2018; OIE, 2019).



**Figura 64.** Microscopía de campo oscuro a 40x; cepa de *Leptospira* 014 en medio líquido.

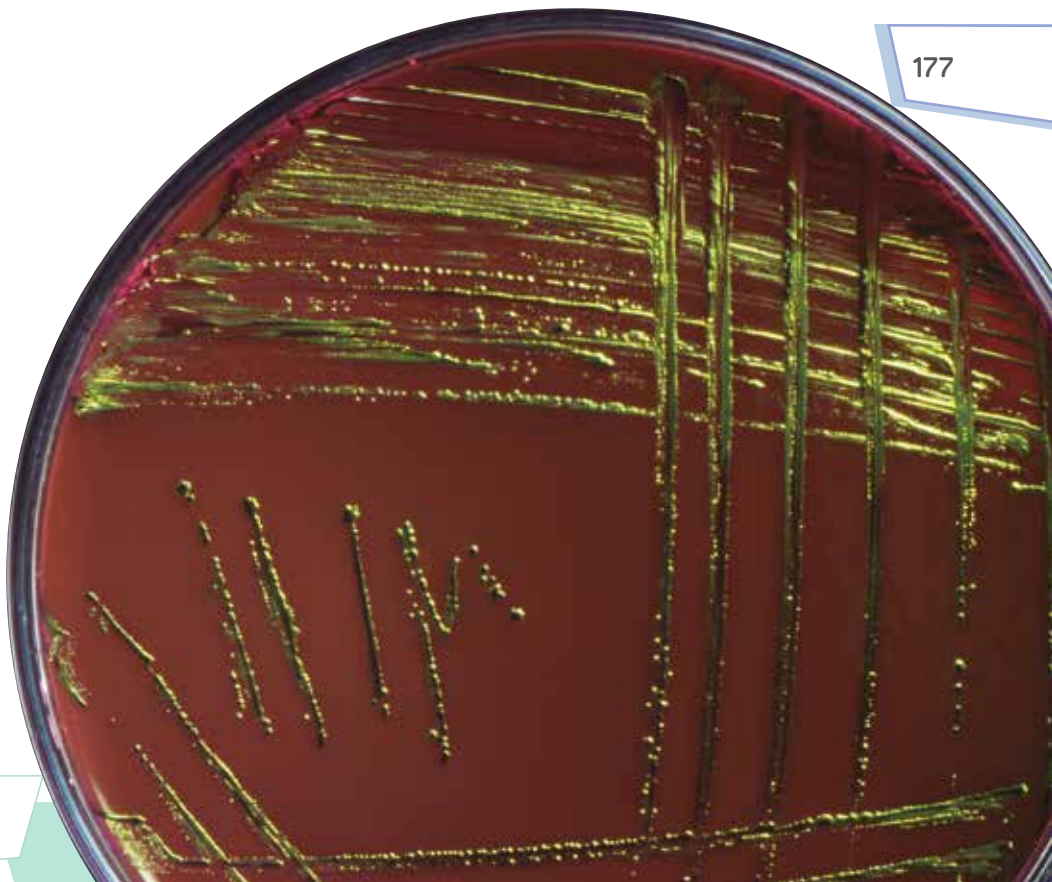
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



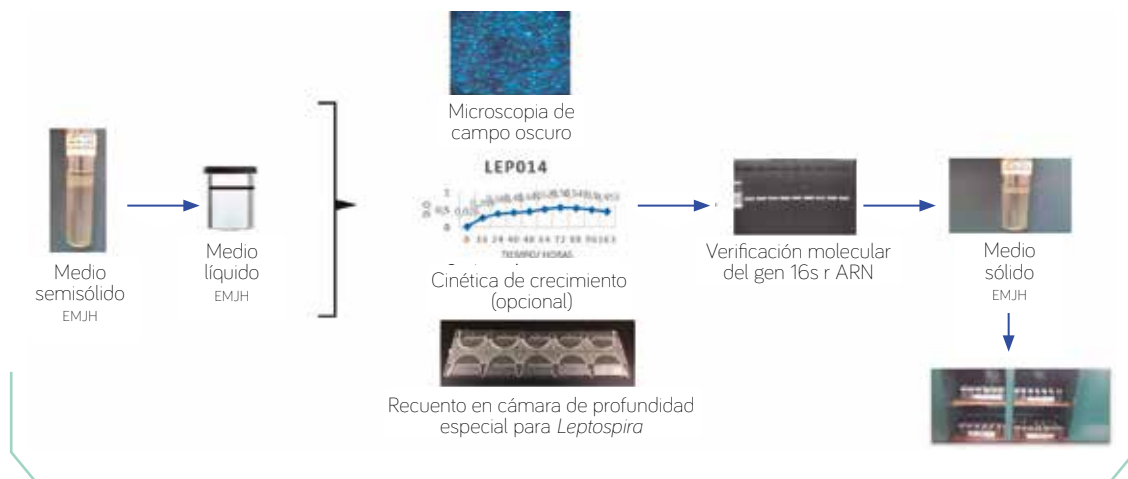
**Figura 65.** Microscopía de campo oscuro a 40x; cepa de *Leptospira* 014 en medio semisólido.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

*Escherichia coli* en agar EMB →  
(eosina azul de metileno), CMISA



La reactivación y mantenimiento del cepario de *Leptospira* consiste básicamente en observar motilidad y uniformidad celular por microscopía de campo oscuro y confirmar pureza del cultivo por siembra en medios de enriquecimiento. En caso de observar una posible contaminación, se realiza filtración por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , se pone a crecer en el medio EMJH líquido y, posteriormente, se verifica pureza y viabilidad para su posterior siembra en el medio EMJH de mantenimiento semisólido, lo cual se pone a crecer en condiciones estáticas, hasta observar la zona de crecimiento o anillo de Dinger (Cameron, 2015; Zuerner, 2005), para su posterior rotulación e ingreso al banco (figura 66) (Adler & De la Peña Moctezuma, 2010; González et al., 2006; OIE, 2019).

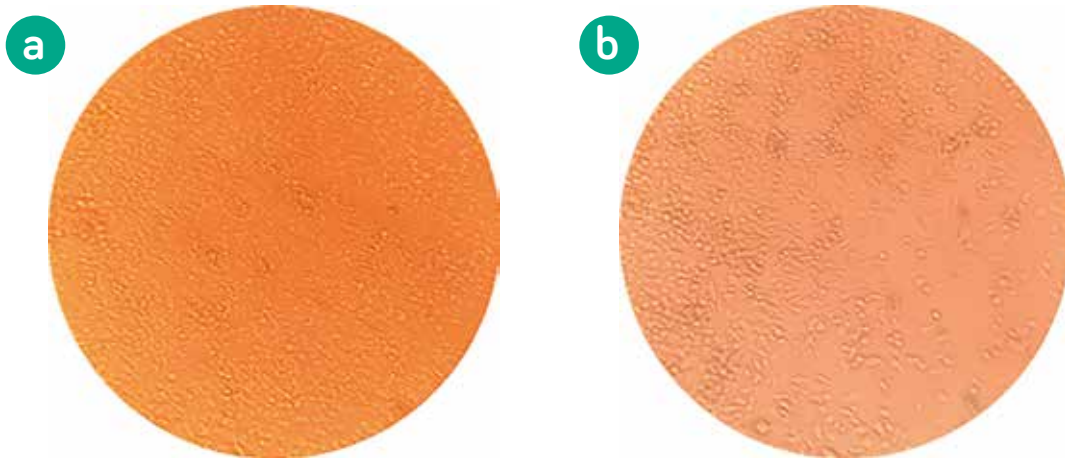


**Figura 66.** Mantenimiento de cepas de *Leptospira* a temperatura ambiente.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

### Conservación de líneas celulares de garrapata IDE8-ISE6

En 2019, la colección de ectoparásitos y hemoparásitos adquirió dos líneas celulares de garrapata del género *Ixodes* (figura 67), con el fin de realizar su estandarización y establecimiento *in vitro*; el objetivo a largo plazo es realizar, de manera *in vitro*, la evaluación de viabilidad de algunas de las especies de hemoparásitos de la colección, la realización de ensayos más completos para el estudio de la interacción hemoparásito-vector y la disminución en el uso de semovientes experimentales.



**Figura 67.** Líneas celulares de garrapata con objetivo de 100 × y con microscopio invertido.  
**a.** ISE6; **b.** IDE8.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



**Figura 68.** Incubación de las líneas celulares IDE8-ISE6.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

En la actualidad, las líneas celulares se conservan en incubación a 32 °C (figura 68), y el medio de cultivo se realiza de acuerdo con lo reportado en la literatura (Munderloh & Kurtti, 1989). Al respecto, el proceso de cambio de medio y de realización de subcultivos se describe a continuación:

#### Cambio de medio:

- Del tubo de cultivo primario, con pipeta volumétrica graduada de 5 mL, se aspiran 1,5 mL de medio y se descartan.
- Posteriormente, a partir del medio L-15B o L-15B300 (dependiendo de la línea celular), se dispensan 1,5 mL de medio fresco.

#### Subcultivo:

- Del tubo de cultivo primario, con pipeta volumétrica graduada de 5 mL, se aspiran 1,5 mL de medio y se descartan.
- Posteriormente, a partir del medio L-15B o L-15B300 (dependiendo de la línea celular que se vaya a subcultivar), se dispensan 3,7 mL de medio fresco en el tubo de cultivo primario y se homogeneiza suavemente tres veces.
- Una vez se homogeneiza, se aspiran 2,2 mL del medio del tubo de cultivo primario y se dispensa este medio en el tubo destinado para el subcultivo.

### Otros métodos de conservación

La CMISA conserva una colección de hemoparásitos, los cuales son conservados bajo metodologías no descritas para microorganismos, pues se trata de métodos para animales experimentales cuya conservación se realiza a 26 °C.

180

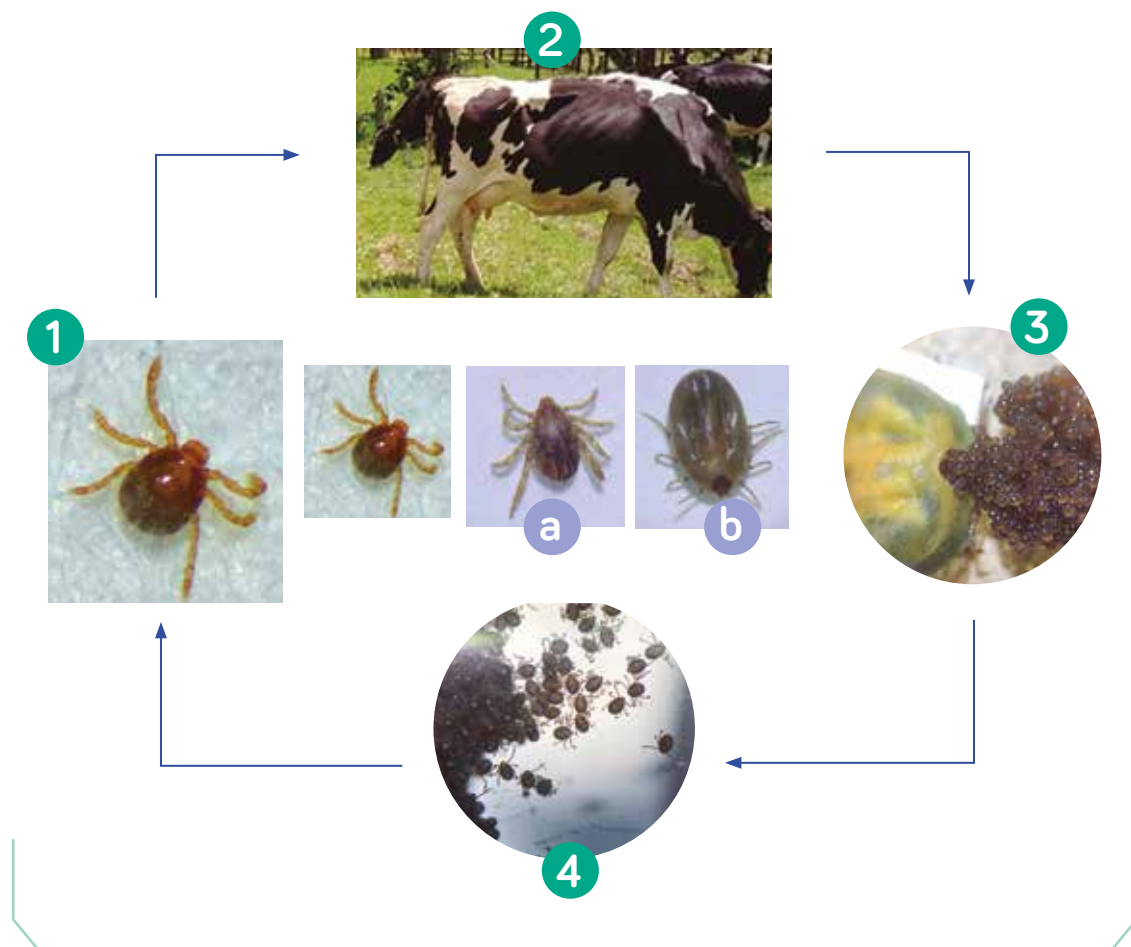


#### Conservación en animales experimentales: fase parasítica *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

En la colección de ectoparásitos existen tres colonias de garrapatas *R. (B.) microplus*: dos de ellas —Palma de Vino y Montecitos (Benavides et al., 2006; Palomares Velosa & Rodríguez Bautista, 2011)— son nativas del país y presentan perfiles de multirresistencia a acaricidas, mientras que la tercera —Porto Alegre— es de origen brasileño y es una colonia de referencia por su perfil de susceptibilidad a acaricidas.

← *Rhipicephalus (B.) microplus*: base del capitulum y palpos, CMISA

El ciclo de vida de la garrapata *R. (B.) microplus* se compone de una fase parasítica, que comprende el paso de larva a los estadios de ninfa y, finalmente, adulto; los tres estadios ocurren sobre un mismo hospedador (figura 69) (Rosa & Ribicich, 2012). Para el mantenimiento de esta fase, la colección de ectoparásitos de AGROSAVIA emplea terneros *Bos taurus* de cuatro meses de edad (sin exposición previa a garrapatas/acaricidas) para llevar a cabo infestaciones experimentales, con larvas de garrapatas, en las instalaciones de la Unidad de Garrapatas (figura 70).



**Figura 69.** Ciclo de vida de las colonias *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 1. Larva; 2. Alimentación de la larva y muda de estadios parasitarios en el hospedador (**a.** Macho; **b.** Hembra); 3. Hembra ingurgitada cae e inicia oviposición; 4. Eclosión de larvas.

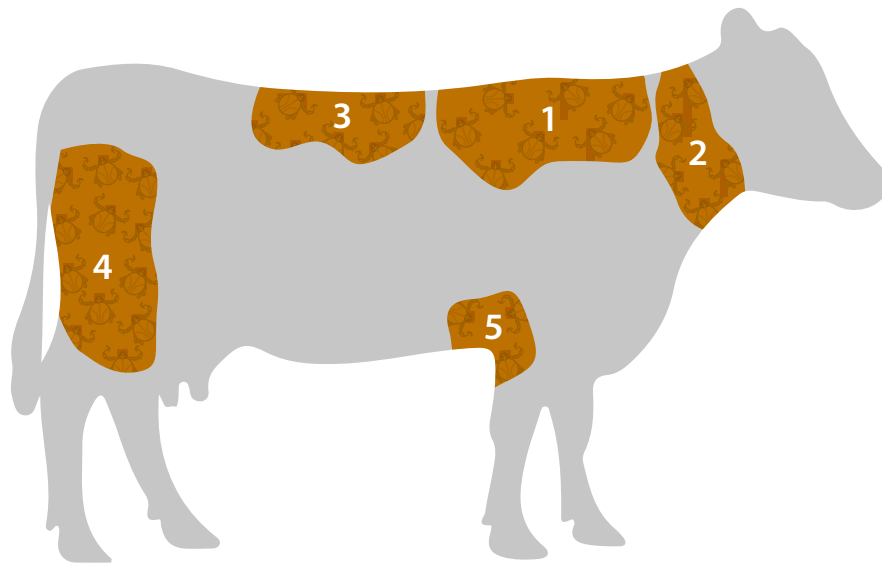
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio Lopez Ardila



**Figura 70.** Unidad de infestación experimental.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio Lopez Ardila

La infestación se realiza utilizando un vial con larvas de garrapata de nueve semanas de edad, las cuales se ubican en zonas anatómicas específicas del ternero (figura 71), mediante el uso de un pincel. Transcurridos entre 21 y 25 días, las larvas alcanzan el estadio de adultez (teleoginas), se desprenden del hospedador y caen al suelo, donde inicia la fase no parasítica.



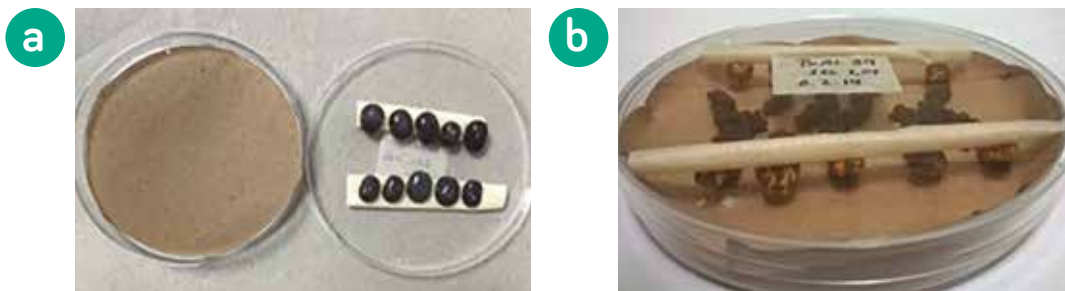
**Figura 71.** Ubicación anatómica de larvas de *R. (B.) microplus* en infestación experimental.  
1. Espalda; 2. Cuello y pecho; 3. Dorso; 4. Muslo; 5. Axila.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio Lopez Ardila

### Incubación a 26 °C: fase no parasítica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Las teleginas colectadas por un día son llevadas al laboratorio, donde se lavan con agua para retirar los detritos orgánicos y se secan con toallas absorbentes. Se seleccionan diez ejemplares de manera aleatoria y se conforma el grupo denominado "índice de eficiencia en conversión (IEC)" (Drummond & Whetstone, 1970); estos ejemplares son pesados (el valor es registrado en el cuaderno de campo) y, finalmente, ubicados en una caja de Petri (figura 72).

183



**Figura 72.** Grupo índice de eficiencia en conversión (IEC). a. Ubicación de diez teleginas ingurgitadas en una caja de Petri; b. Postura y colecta de huevos de diez teleginas.

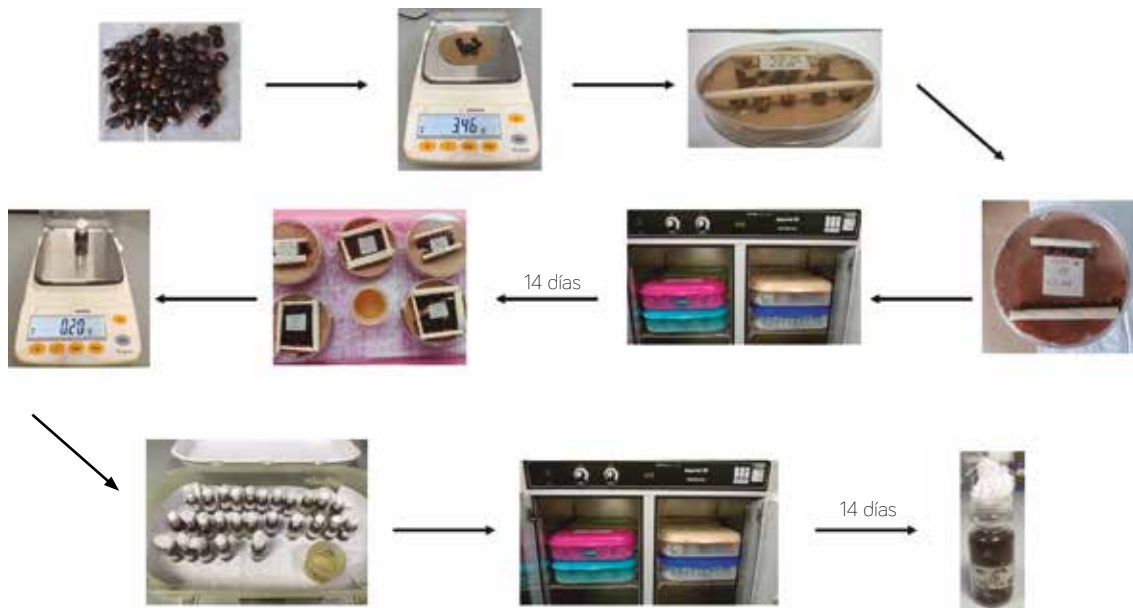
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio Lopez Ardila

**Capítulo VI.** Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA)  
(bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

Por su parte, las teleginas restantes son agrupadas de a 25 ejemplares y agrupadas, también, en cajas de Petri. Todas las cajas de Petri son llevadas a incubación a  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a una humedad relativa del 85 %. El periodo de oviposición de las garrapatas de la colección es de catorce días, y, transcurrido este tiempo, los huevos del grupo IEC son pesados y transferidos a un vial de vidrio de 5 mL, que es sellado con gasa hospitalaria. Una vez se cuenta con el peso tanto de las diez teleginas como de sus huevos, es posible calcular el IEC de la siguiente forma:

$$\text{IEC} = \frac{\text{Peso de los huevos}}{\text{Peso de las teleginas}}$$

Los huevos de las cajas de Petri restantes son pesados en cantidades correspondientes a 1 g, transferidos a viales de vidrio y sellados con gasa hospitalaria (figura 73). Los viales se ubican en incubación y se realiza seguimiento de la fecha de eclosión, que se estima que es de catorce días para las colonias de la colección. Para cada réplica generada se colecta información de parámetros del IEC (Benavides, 1982).



**Figura 73.** Mantenimiento de la fase no parasítica.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio Lopez Ardila

## Autenticación de cepas

En la CMISA se realiza, de manera rutinaria, evaluación de la viabilidad y pureza de las cepas conservadas bajo diferentes métodos de preservación, para lo cual se aplican técnicas fenotípicas y moleculares, para confirmar la supervivencia del material biológico conservado.

### Métodos de autenticación de cepas bacterianas (*Staphylococcus*, *Escherichia coli* O157:H, *Salmonella*, *Brucella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leptospira*)

Teniendo en cuenta los grupos de microorganismos que se conservan en la CMISA, se establecieron diferentes métodos de autenticación para seis grupos bacterianos, descritos a continuación.

#### Autenticación de la colección de *Staphylococcus* sp.

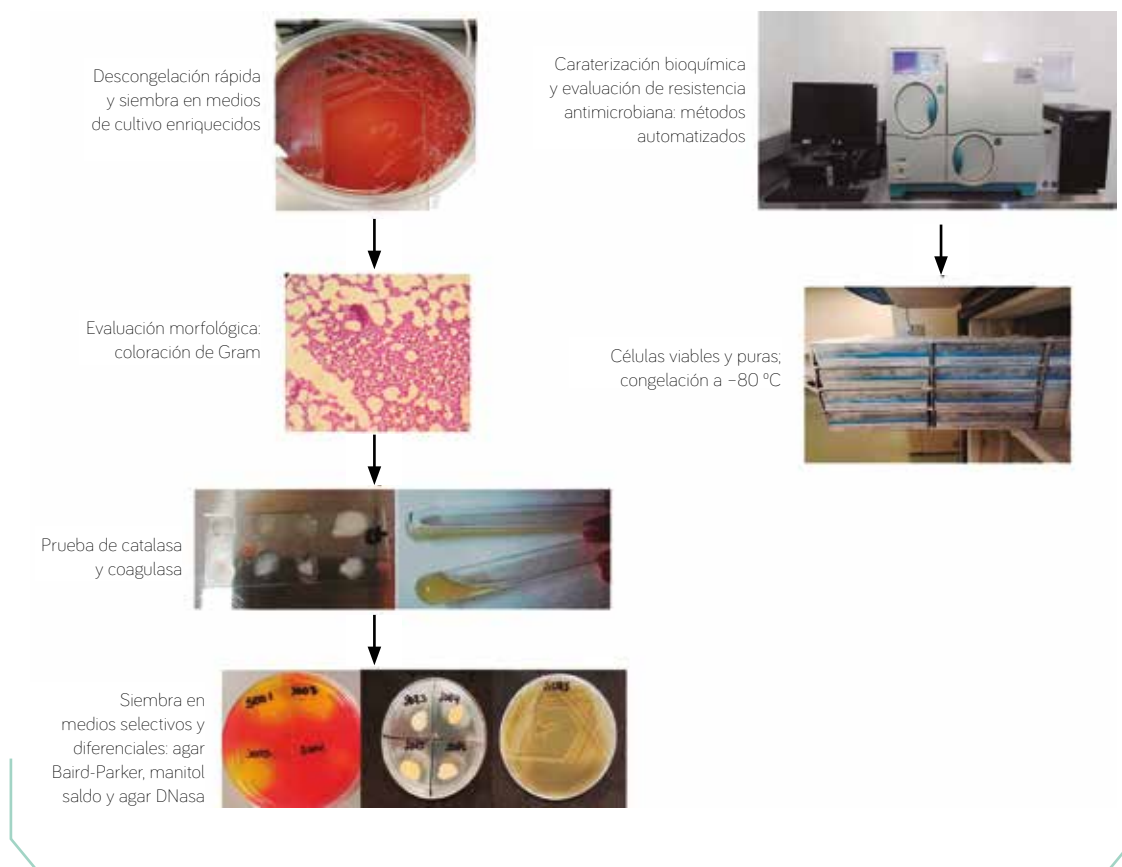
El género *Staphylococcus* es un grupo muy diverso, pues está compuesto por 54 especies y 28 subespecies clasificadas de acuerdo con la capacidad de producir la enzima coagulasa y la habilidad de coagular el plasma sanguíneo: así, se clasifican como *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP) y *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) (Mehmeti et al., 2016; Pumipuntu et al., 2017). Estos microorganismos son causantes de enfermedades de importancia clínica y epidemiológica en humanos y animales (Becker et al., 2014; Gómez-Sanz et al., 2019). En Colombia, en cuanto al sistema de producción animal, son unos de los microorganismos que más se asocian a casos de mastitis bovina (Calderón Rangel et al., 2011; Raemy et al., 2013; Sánchez Bonilla et al., 2018). En la colección de bacterias existen 385

*Leptospira* sp. en rojo congo, CMISA →



accesiones aisladas de leche bovina de diferentes departamentos en Colombia, y, de estas, 178 están clasificadas como *S. aureus*, y el resto, entre scp (diferentes a *S. aureus*) y scn. La evaluación de viabilidad y pureza de todo el cepario se realiza mediante reactivación rápida en medios enriquecidos y nutritivos. A partir de cultivos puros, se realiza tinción de Gram para la confirmación morfológica del microorganismo. También se realiza la prueba de catalasa y la prueba de coagulasa, que es un factor de virulencia que se actúa sobre fibrinógeno celular y ayuda a la colonización del microorganismo en el huésped (Bonar et al., 2015).

También se confirma el crecimiento en medios selectivos y diferenciales comerciales para cepas de *S. aureus* en el agar Baird-Parker (composición en g/L: digerido pancreático de caseína: 10; extracto de carne: 5; piruvato de sodio: 10; extracto de levadura: 1; glicina: 12; LiCl: 5, y agar: 20), en el que se determina la reducción del telurito a telurio, lo cual origina colonias de color grisáceo-negro y descomposición de la yema de huevo por la presencia de enzimas lecitinasas y lipasas, lo que produce, alrededor de la colonia, una zona opaca que a menudo presenta una zona clara externa. Asimismo, se puede usar el agar manitol salado (composición en g/L: extracto de carne bovina: 1; digerido pancreático de caseína: 5; digerido péptico de tejido animal: 5; NaCl: 75; D-manitol: 10; rojo de fenol: 0,025, y agar: 15), en el cual se evidencia el crecimiento en un medio de alta concentración de sal y fermentación de manitol, con cambio en el indicador de pH del color rojo, pues muestra colonias amarillas. Igualmente, con el agar DNasa (composición en g/L: triptosa: 20; ácido desoxirribonucleico: 2; NaCl: 5, y agar: 12), se evalúa la presencia de la enzima termoestable DNasa, que causa hidrólisis del ADN. El ácido clorhídrico (HCl 1N) se utiliza para determinar la actividad enzimática, y su resultado muestra una zona transparente alrededor de la colonia (Asfour & Darwish, 2011; El-Hadedy & El-Nour, 2012). En algunos casos, cuando se requiere la confirmación de identidad de una accesión, se realiza un análisis bioquímico mediante el uso de tarjetas Vitek, un sistema automatizado que se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. Para la evaluación de sensibilidad antimicrobiana, por su parte, se utilizan tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (figura 74).

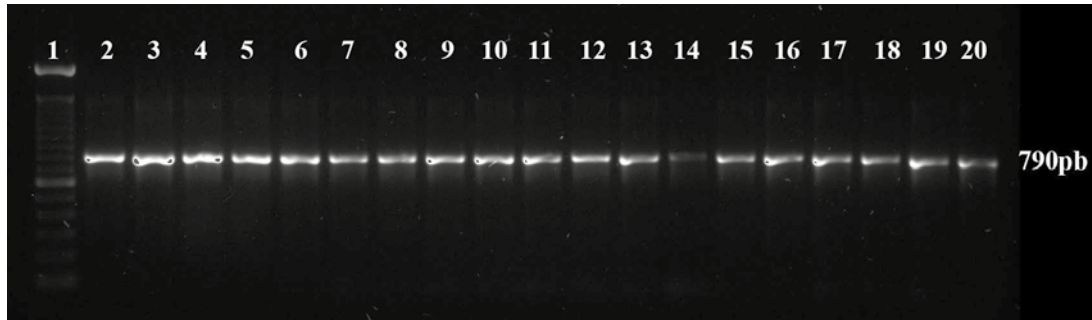


**Figura 74.** Flujo de trabajo para el control de calidad en cepas de *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

La caracterización molecular para la validación de los métodos de conservación de cepas de *Staphylococcus*, así como para la confirmación del género, consiste en amplificación, por PCR, de una región de 791pb del gen 16S rARN, empleando el siguiente iniciador *forward*: 5'CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG3' (figura 75) (Mason et al., 2001). De manera específica para cepas clasificadas como *S. aureus*, se realiza detección del gen *nuc*, empleando los siguientes iniciadores: 5'ATATGTATGGCAATCGTTTCAAT3' y 5'GTAAATGCACTTGCTTCAGGAC3' (Gao et al., 2011), y también detección del gen *coa*, que es un factor de virulencia en *S. aureus*, empleando los siguientes iniciadores: 5'ATAGAGATGCTGGTACAGG3' y 5'GCTTCCGATTGTTTCGATGC3' (Dastmalchi Saei et al., 2009). Para cepas de *scn*, realizar la autenticación por métodos moleculares requiere la inclusión de otros marcadores genéticos que muestren mayor resolución que el gen 16S rARN en cuanto a la diferenciación de especies muy cercanas filogenéticamente. Para esto, en la CMISA se está trabajando en el uso de genes constitutivos —como los genes *tuf*, *tpi* y

*pta*, entre otros— que puedan ayudar a la clasificación taxonómica de este grupo tan heterogéneo dentro del género *Staphylococcus* (Krishnamoorthy et al., 2016; Wanecka et al., 2018).



**Figura 75.** Identificación molecular de cepas de *Staphylococcus* mediante análisis del gen 16S rARN.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

### Autenticación de la colección de *E. coli* O157:H7

En la colección de bacterias hay siete cepas de *E. coli* O157:H7, las cuales fueron obtenidas de materia fecal de terneros. Algunos rumiantes, como los bovinos, cerdos y ciervos, pueden servir como reservorio de este microorganismo y causar enfermedades de importancia en salud pública (Díaz-Sánchez et al., 2012; Kumar et al., 2013). La viabilidad y pureza de esta bacteria se realiza mediante reactivación en medios de cultivo nutritivos y diferenciales. Después, se evidencia la morfología celular mediante tinción de Gram (figura 76), que arroja bacilos Gram-negativos. A partir de cultivos puros, se hacen repiques en medios selectivos, como agar MacConkey-sorbitol (MK-S), para determinar la no fermentación del sorbitol y poder diferenciar el microorganismo de otros *E. coli*. También se pueden utilizar otros medios para la diferenciación entre enterobacterias, como agar TSI (hierro-triple azúcar; composición en g/L: digerido pancreático de caseína: 10; digerido péptico de tejido animal: 10; NaCl: 5; lactosa: 10; sacarosa: 10; dextrosa: 1; FeSO<sub>4</sub>: 0,2; tiosulfato sódico: 0,2; rojo de fenol: 0,025, y agar: 13), agar urea (composición en g/L: tripteína: 1; glucosa: 1; NaCl: 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2; rojo de fenol: 0,012, y agar: 15), agar citrato (composición en g/L<sup>-1</sup>: MgSO<sub>4</sub>: 0,2; NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,2; [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>[PO<sub>4</sub>]: 0,8; citrato de sodio tribásico: 2; NaCl: 5; azul de bromotimol: 0,08, y agar: 15), LIA (agar lisina-hierro; composición en g/L<sup>-1</sup>: peptona de gelatina: 5; extracto de levadura: 3; glucosa: 1; lisina: 10; citrato de hierro y amonio: 0,5; tiosulfato de sodio: 0,04; púrpura de bromocresol: 0,02, y agar: 15) y SIM (*sulfide indole motility*; composición en g/L: digerido pancreático de caseína: 20; digerido péptico de

amonio: 0,2; FeSO<sub>4</sub>: 0,2; tiosulfato sódico: 0,2, y agar: 3,5) (tabla 10) (Janezic et al., 2013; Narváez-Bravo et al., 2007).

El perfil bioquímico también puede ser determinado con métodos automatizados, como API 20E. El seguimiento fenotípico también incluye una evaluación serológica por pruebas de aglutinación en partículas de látex para confirmación del antígeno somático O157 y el flagelar H7, lo cual incluye controles positivos y negativos. Las cepas de *E. coli* O157:H7 poseen factores de virulencia que favorecen su patogenicidad, como la citotoxina *Shiga-like*. Molecularmente, se puede realizar la confirmación molecular mediante la detección de blancos genéticos como *stx1* (*forward*: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG; *reverse*: CACCAGACAATGTAACCGCTG) y *stx2* (*forward*: ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG; *reverse*: GCGTCATCGTATACACAGGAGC) (Méndez et al., 2013; Nagano et al., 2004).

**Tabla 10.** Perfil bioquímico de *E. coli* O157:H7

Cepa	Citrato	Urea	TSI	LIA	SIM
<i>E. coli</i> O157:H7	Negativo	Positivo	A/A Producción de gas: positivo H <sub>2</sub> S: negativo	K/K H <sub>2</sub> S: negativo	S: negativo I: positivo M: positivo

Nota: A/A: fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa; K/K: descarboxilación de la lisina; S: producción de H<sub>2</sub>S; I: indol; M: motilidad.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

### Autenticación de la colección de *Salmonella*

La viabilidad y pureza de las cepas de *Salmonella* se evalúa con reactivación en medios de cultivo nutritivos y diferenciales. Después, se evidencia la morfología celular mediante tinción de Gram (figura 76), que arroja bacilos Gram-negativos. A partir de cultivos puros, se hacen repiques en medios selectivos, como agar entérico de Hektoen (HEA, por sus siglas en inglés) y agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), para evidenciar la fermentación de azúcares como la glucosa; así, se observan colonias verdeazuladas con o sin centro negro y colonias rojas con centros de color negro, respectivamente. También se pueden utilizar otros medios para la diferenciación entre enterobacterias, como agar TSI, urea, citrato, LIA y SIM (tabla 11) (Liu et al., 2010).

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

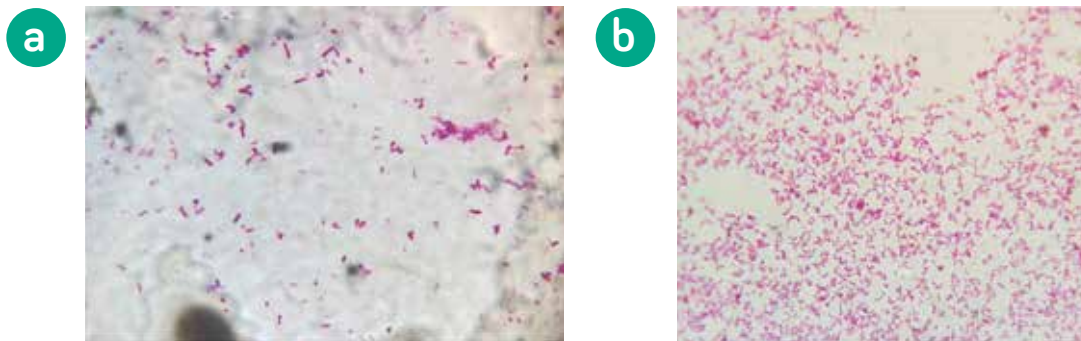
La identificación completa del género *Salmonella* exige una evaluación serológica (serotipificación), en la cual las cepas se clasifican en serovariedades, según la gran diversidad de antígenos somáticos (O) del lipopolisacárido y antígenos proteicos de los flagelos (H), de acuerdo con el esquema de White-Kauffmann-Le Minor, con lo que se obtiene su fórmula antigénica mediante el uso de una gran batería de antisueros monovalentes y polivalentes (Ibrahim & Morin, 2018; OIE, 2019, capítulo 3.7.10).

**Tabla 11.** Perfil bioquímico de *Salmonella*.

Cepa	Citrato	Urea	TSI	LIA	SIM
<i>Salmonella</i>	Positivo	Negativo	K/A Producción de gas: positivo H <sub>2</sub> S: positivo	K/K H <sub>2</sub> S: positivo	S: positivo I: negativo M: positivo

K/A: fermentación de glucosa; K/K: descarboxilación de la lisina; S: producción de H<sub>2</sub>S; I: indol; M: motilidad.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca



**Figura 76.** Microscopía de tinción de Gram a 100x.

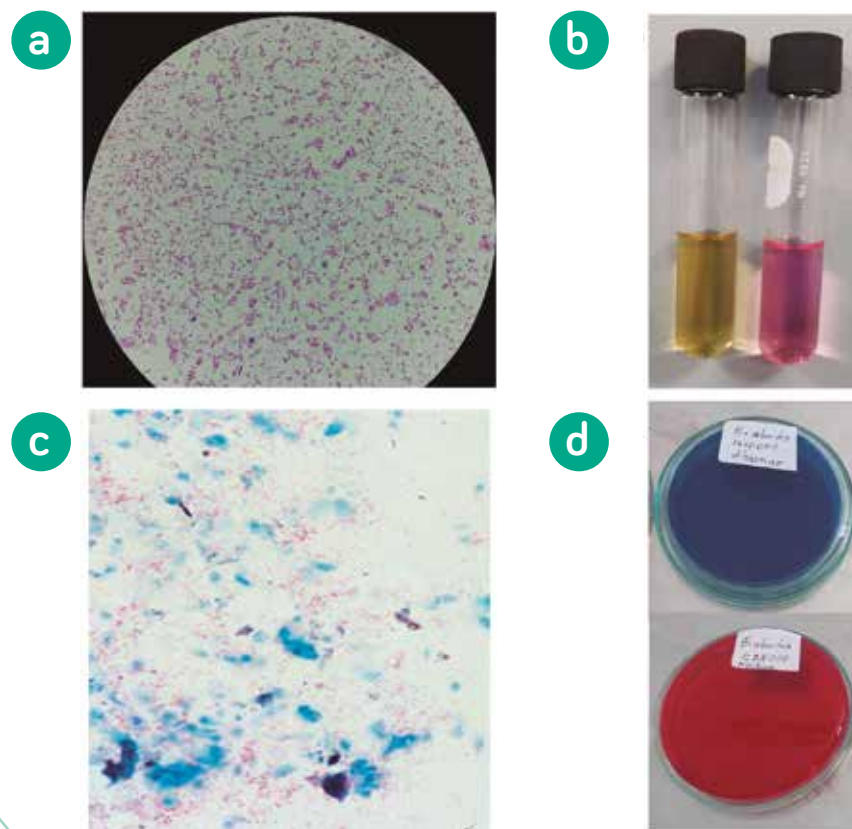
a. Cepa de *E. coli* O157:H7; b. *Salmonella* spp.: bacilos Gram-negativos.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

### Autenticación de la colección de *Brucella abortus*

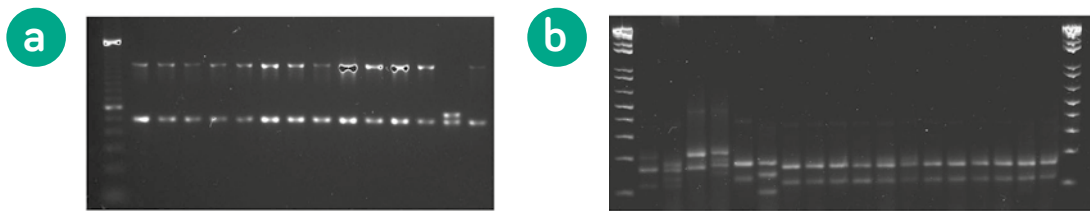
Las cepas de *B. abortus* causan la brucelosis bovina, una enfermedad zoonótica endémica que genera cuantiosas pérdidas económicas en la industria pecuaria, con un alto impacto en la salud pública. En Colombia, la información sobre la circulación de biovares de *B. abortus* es escasa o inexistente. En la CMISA existen 12 aislamientos de *B. abortus*, de origen bovino, procedentes del

departamento de Nariño, y 6 cepas de referencia. Estas cepas fueron identificadas hasta biotipo por métodos convencionales: morfología macro y microscópica, actividad enzimática, descripción de perfiles bioquímicos, utilización de sustratos y sensibilidad a colorantes (figura 77). La caracterización fenotípica fue reforzada mediante tres estrategias moleculares: una PCR múltiple denominada AMOS-*ery*-PCR, RFLP-IS711, hibridación *Southern blot* y análisis multilocus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA), empleando como marcador molecular el gen *ery*, encargado del catabolismo del eritritol en todos los miembros del género *Brucella*. Los resultados de la caracterización fenotípica y molecular de los 12 aislamientos permitieron su identificación como *B. abortus* biovar 4, además de la diferenciación de estos aislamientos entre cepas de campo y posibles cepas vacunales (figura 78) (Bricker & Halling, 1994; Ledwaba et al., 2019; Ocampo-Sosa et al., 2005; Pacheco-Montealegre et al., 2017; Torres Higuera et al., 2019; Whatmore et al., 2014).



**Figura 77.** Pruebas de microbiología convencional de *Brucella abortus*. a. Tinción de Gram; b. Producción de ureasa; c. Tinción de Stamp; d. Crecimiento en presencia de colorantes (fucsina básica y tionina).

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

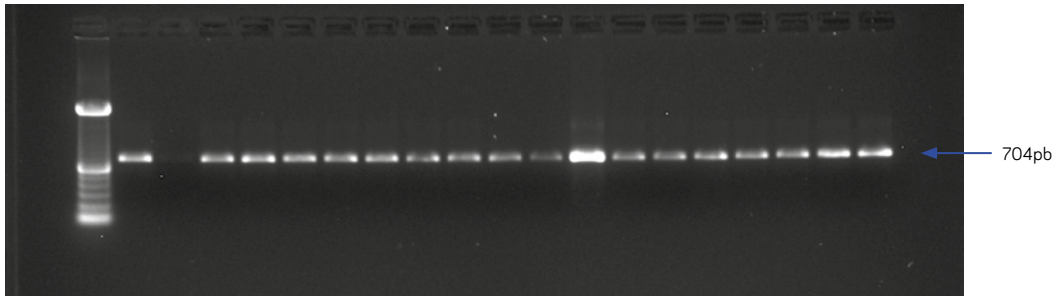


**Figura 78.** Caracterización molecular de aislamientos de *B. abortus* de la CMISA. **a.** AMOS-ery-PCR; **b.** Análisis multilocus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA).

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

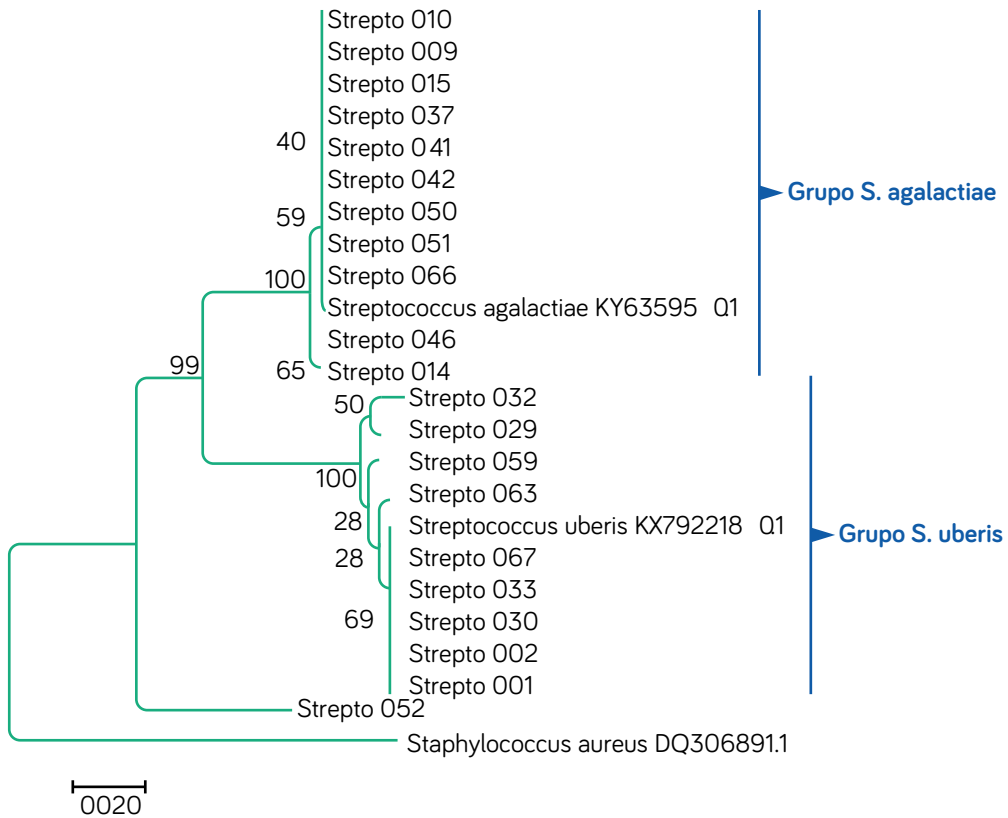
### Autenticación de la colección de *Streptococcus*

La colección de bacterias cuenta con 68 accesiones del género *Streptococcus*. Este género es de los que más se asocian a casos de mastitis bovina, enfermedad de importancia económica en el sistema de producción bovina en Colombia (Calderón Rangel et al., 2011; Raemy et al., 2013; Sánchez Bonilla et al., 2018). Estos microorganismos se relacionan tanto con la forma clínica como con la subclínica de la mastitis y son patógenos obligados de la ubre bovina (Dieser et al., 2017; Käppeli et al., 2019; Lakew et al., 2019; Minst et al., 2012; Rato et al., 2013; Reinoso et al., 2015). La evaluación de viabilidad y pureza de las accesiones de *Streptococcus* spp. se realiza mediante reactivación en medios enriquecidos, como agar sangre. Además, se evidencia la morfología microscópica por tinción de Gram y se realiza la prueba de catalasa. La autenticación de cepas de *Streptococcus* también puede ser realizada con kits comerciales, pero, para completar la información taxonómica, se puede realizar la amplificación del gen 16S rARN. En la CMISA se ha estandarizado una PCR para la amplificación de una región de 704pb del gen 16S rARN específica para *Streptococcus* (*forward*: TGCAAGTAGAACGCTGAGGAC; *reverse*: CAGTTACAGACCAGAGAGCCG) (figura 79). Se considera que las técnicas moleculares podrían proporcionar mayor precisión en la identificación de aislamientos de *Streptococcus* de origen bovino, en relación con la variabilidad de los métodos bioquímicos automatizados disponibles (McDonald et al., 2005; Tomazi et al., 2019). Dentro de la colección, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae* son las especies que se encuentran en mayor número y, a su vez, las que más se asocian a infecciones de la glándula mamaria bovina (figura 80) (Dieser et al., 2017; Käppeli et al., 2019; Lakew et al., 2019; Rato et al., 2013; Reinoso et al., 2015).



**Figura 79.** Identificación molecular de cepas de *Streptococcus* mediante análisis del gen 16S rARN.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



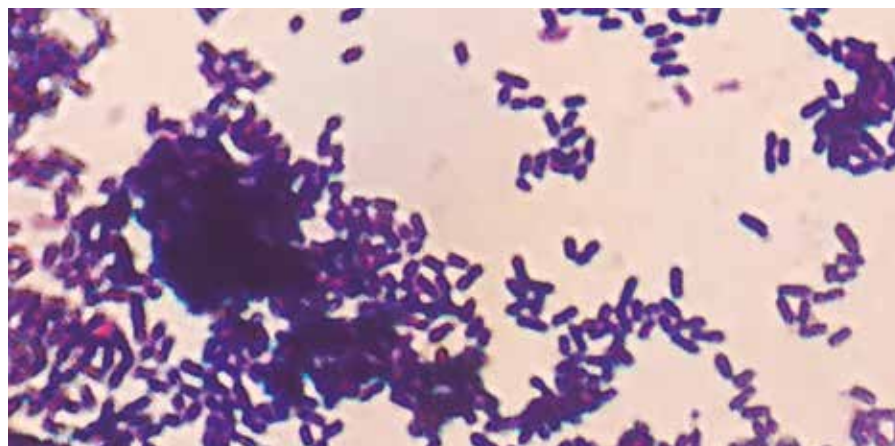
**Figura 80.** Relación filogenética entre 24 cepas basada en el análisis del gen 16S rARN.

Nota: El dendrograma fue construido con el método *neighbor-joining* con *bootstrap* de 1.000 iteraciones.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

### Autenticación de la colección de *Lactobacillus*

En la colección de bacterias hay 39 cepas ácido-lácticas, de las cuales 21 pertenecen al género *Lactobacillus*, que fueron obtenidas de leche bovina en diferentes departamentos de Colombia. Estas bacterias son consideradas probióticas: “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio fisiológico para la salud del huésped” (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] & World Health Organization [WHO], 2006, p. 2; traducción propia). Además, estos microorganismos poseen propiedades benéficas que ayudan a controlar microorganismos patógenos, como la capacidad de adherirse a la célula, reducir la adherencia de bacterias patógenas, coagregarse y producir ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, CO<sub>2</sub>, diacetilo, acetaldehído, D-isómero de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal; son un grupo heterogéneo de proteínas, con amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus*, causante de mastitis bovina (Gaspar et al., 2018; Ren et al., 2018; Souza et al., 2017; Titze & Krömker, 2020). La confirmación de la viabilidad y pureza de estas cepas se realiza mediante la evaluación de su crecimiento en medio MRS; también se realiza la prueba de catalasa (reacción negativa), y se evidencia su morfología microscópica en bacilos Gram-positivos (figura 81). En cuanto a métodos moleculares, estas cepas se han evaluado mediante la amplificación de una región del gen 16S ADNr (*forward*: CTTGTACACACCG-CCCGTCA; *reverse*: CTCAAACTAAACAAAGTTTC) (Dubernet et al., 2002).

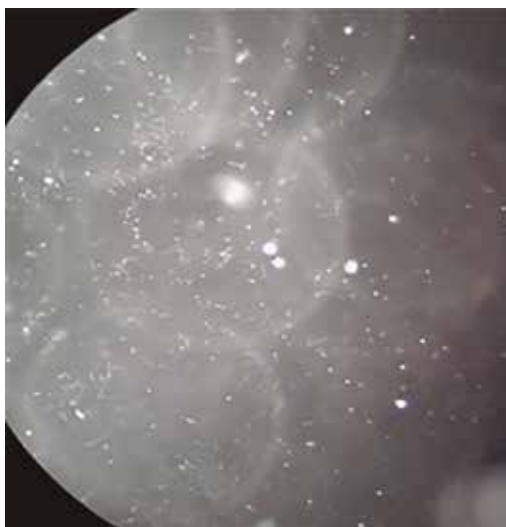


**Figura 81.** Microscopía de tinción de Gram de la cepa 039 de *Lactobacillus* a 100x: bacilos Gram-positivos.

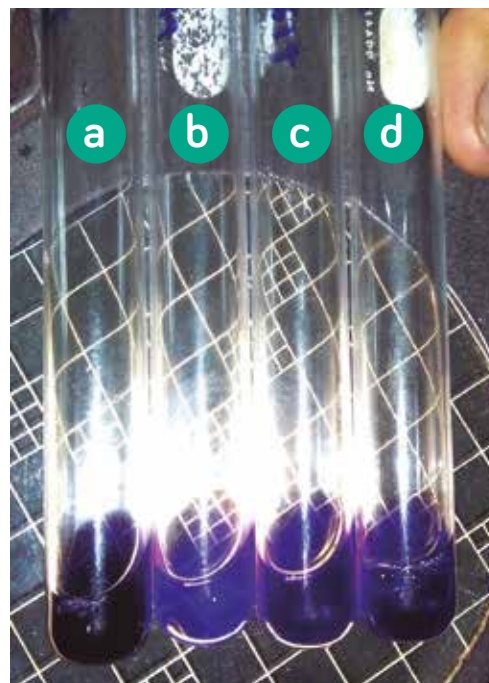
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

## Autenticación de la colección de *Leptospira*

Existen varias pruebas fenotípicas para diferenciar entre bacterias de *Leptospira* patógenas y saprófitas (crecimiento en presencia de 225 mg/L de 8-azaguanina, crecimiento a 13 °C, conversión a formas esféricas en 1M NaCl y producción de la enzima oxidasa) (figuras 82 y 83); sin embargo, son pruebas difíciles de realizar, además de que pueden llegar a ser subjetivas, ya que a veces conducen a discrepancias en sus interpretaciones por la ambigüedad que algunas cepas presentan. Estas pruebas no pueden diferenciar entre especies, por lo que no son útiles en la clasificación actual. Por esta razón, la identificación y confirmación de la especie en cepas de *Leptospira* se hace, rutinariamente, mediante técnicas moleculares (Morey et al., 2006; OIE, 2019; Postic et al., 2000).

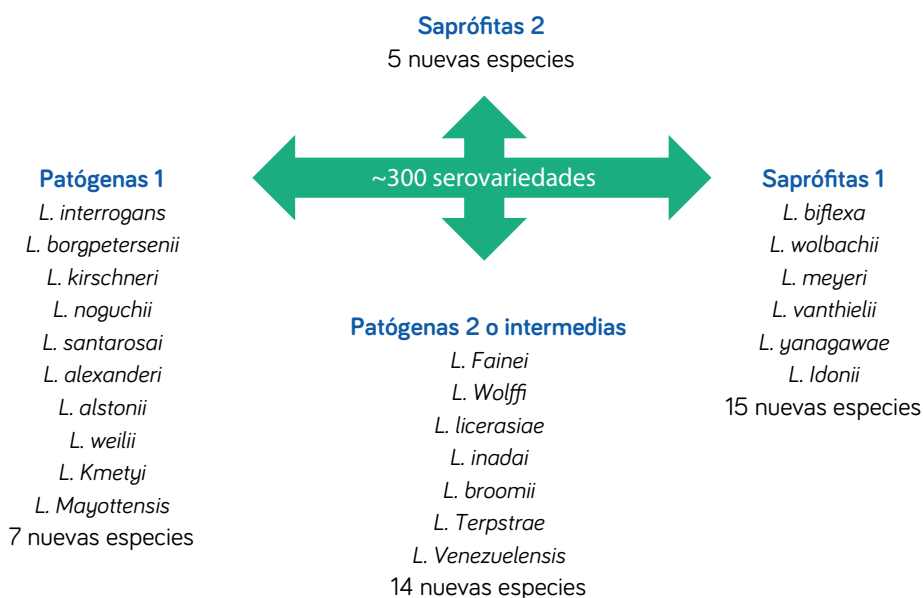


**Figura 82.** Crecimiento del aislamiento patógeno de la cepa 032 de *Leptospira* en 1M NaCl: presencia de formas esféricas.  
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.



**Figura 83.** Prueba de oxidasa. **a.** Cepa de referencia saprófita (*L. biflexa* serovar Patoc); **b.** Cepa de referencia patógena (*L. interrogans* serovar Canicola); **c** y **d.** Aislamientos de las cepas 042 y 092 de *Leptospira* (aislamientos intermedios que se comportan como patógenos en esta prueba).  
Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

*Leptospira* es un género altamente diverso, pues está dividido en 35 especies clasificadas en 3 grupos filogenéticos (patógeno, intermedio y saprófito) que se correlacionan con la virulencia de la bacteria. En estudios recientes se secuenció un total de 90 cepas de *Leptospira* aisladas de diferentes regiones del mundo. Una comparación de los valores promedio de identidad de nucleótidos (ANI) de los genomas de las 90 cepas aisladas y de genomas representativos de especies conocidas reveló 30 nuevas especies de *Leptospira*. Estos datos también respaldaron la existencia de 2 clados y 4 subclados, los cuales fueron llamados P1 (patógenos de alta virulencia), P2 (patogenicidades intermedias), S1 (saprófitos 1) y S2; este último subclado aún no se ha descrito completamente, pero está compuesto por *Leptospira idonii* y 4 especies nuevas que están filogenéticamente relacionadas con los saprófitos (figura 84) (Caimi et al., 2017; Caimi & Ruybal, 2020; Guglielmini et al., 2019; Koval et al., 2020; Puche et al., 2018; Thibeaux, Girault et al., 2018; Thibeaux, Iraola et al., 2018; Vincent et al., 2019). La gran heterogeneidad del género va ligada también a que se encuentran reportados más de 300 serovares, según el lipopolisacárido que presentan en su superficie celular (Bezerra da Silva et al., 2011; Cerqueira & Picardeau, 2009; Zarantonelli et al., 2018).



**Figura 84.** Reclasificación taxonómica del género *Leptospira*, 2019-2020.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

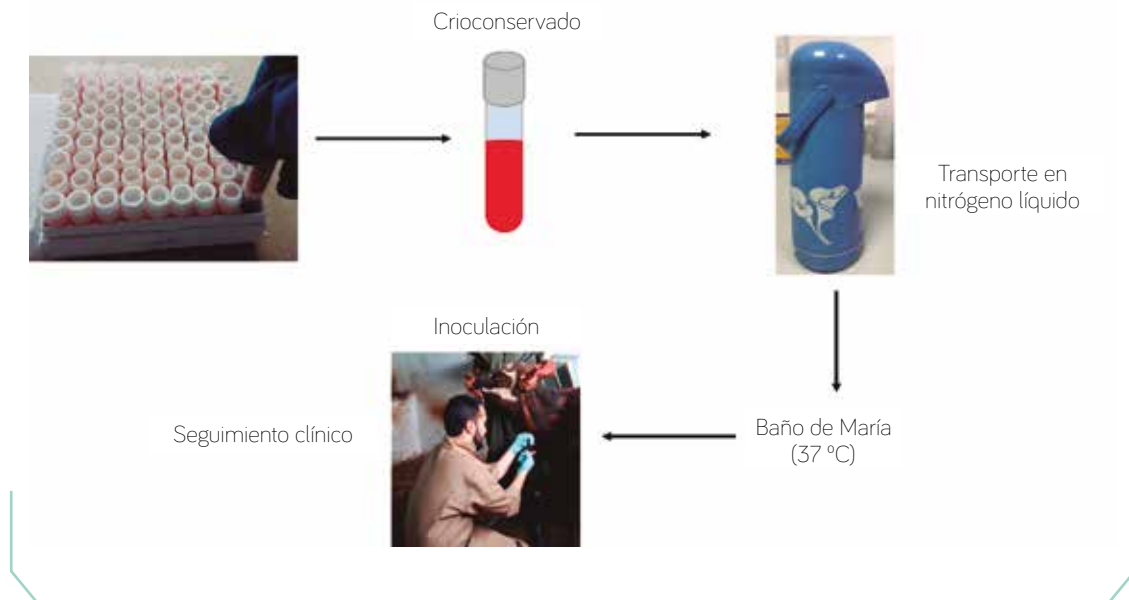
En la colección de bacterias y virus se ha hecho una aproximación a la identificación de serovares mediante técnicas moleculares como ribotipificación *Southern blot* (Kositanont et al., 2007) y análisis MLVA (Pavan et al., 2008; Pavan et al., 2011; Rezasoltani et al., 2015), con las cuales se obtuvieron perfiles genéticos para algunos aislamientos compatibles con serovares patógenos de referencia. Sin embargo, de rutina, en la CMISA, para la identificación y verificación de la autenticidad de las cepas (grupo de patogenicidad, género y aproximación a especie), se utilizan los iniciadores Lept 1.900f y Lept 2.500r (*forward*: 5'CCTCATGGGTCCAAACATGCA3'; *reverse*: CGCATCCTCRAAGTTGTAWCCTT) (La Scola et al., 2006) y los iniciadores A/B 5'GGCGGC-GCGTCTTAAACATG3' y 5'TTCCCCCATTGAGCAAGATT3' (Mérien et al., 1992; Postic et al., 2000), los cuales amplifican una región hipervariable de 600pb del gen *rpoB* y una región de 331 pb del gen *rrs*, respectivamente. Estos dos marcadores moleculares se utilizan para la identificación del género, el grupo de patogenicidad y la aproximación a especie, teniendo en cuenta que el gen 16S rARN presenta baja acumulación de polimorfismos y, por tanto, una menor resolución en la diferenciación de cepas, en contraste con el gen *rpoB*, que tiene la ventaja de contar con una mayor presión de selección natural en el genoma y de presentar un mayor polimorfismo (Cerqueira & Picardeau, 2009; Thibeaux, Iraola et al., 2018). Muchos autores sugieren el uso de por lo menos dos marcadores genéticos para la identificación taxonómica a nivel de especie (Boonsilp et al., 2011).



*Leptospira* sp. en rojo congo. CMISA ↑

## Métodos de autenticación de la colección de hemoparásitos

La evaluación de viabilidad y la caracterización clínico-patológica de la colección de hemoparásitos se basan en la evaluación de las cepas que tienen cinco años o más de haber sido crioconservadas. Esta evaluación se realiza mediante la descongelación del material crioconservado y su inoculación en un semoviente experimental previamente esplenectomizado. Es importante garantizar la temperatura de congelación hasta el momento de la descongelación en baño de María y su inmediata inoculación vía endovenosa (figura 85).



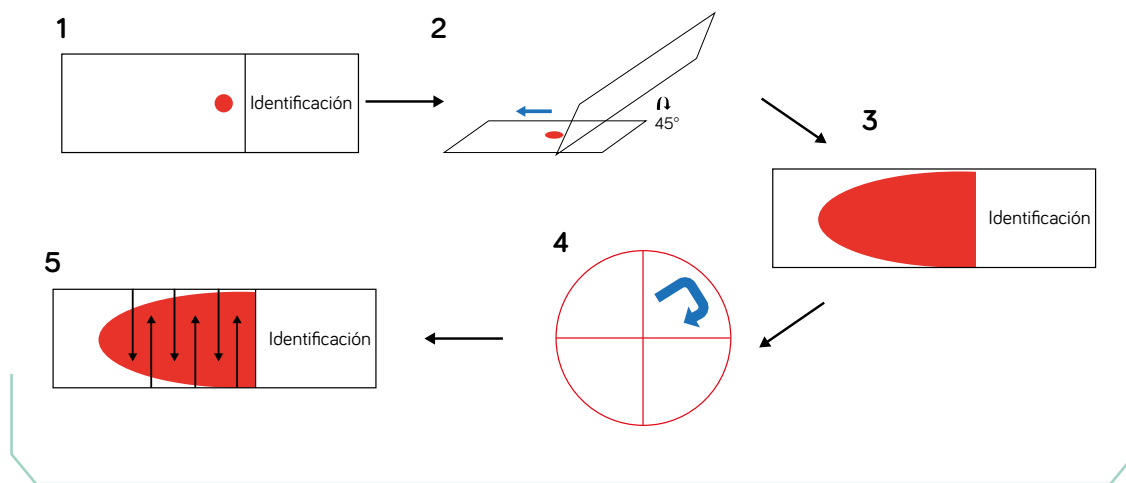
**Figura 85.** Evaluación de viabilidad de las accesiones de hemoparásitos.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio López Ardila

Una vez inoculado el material que se va a evaluar, se comienza el seguimiento clínico con la determinación de la temperatura rectal, el cuadro hemático (porcentaje de hematocritos, y recuento absoluto y diferencial leucocitario), un frotis sanguíneo y la prueba de Woo (1969).

**Frotis sanguíneo:** El diagnóstico convencional de hemoparásitos por medio de microscopía de sangre periférica anticoagulada teñida con coloración de Giemsa al 10 % continúa siendo el método más común para la identificación de animales infectados (OIE, 2019, capítulo 3.4.1); sin embargo, esta metodología presenta baja sensibilidad en estados subclínicos y crónicos, y depende de la habilidad

del laboratorista (Adamu et al, 2016; García-Sanmartín et al, 2006). En la evaluación de la viabilidad de las accesiones de hemoparásitos de la colección, la confirmación de la fase parasistémica se hace mediante la identificación morfológica de los parásitos, a partir de una muestra de sangre periférica (figura 86).



**Figura 86.** Realización y lectura de frotis sanguíneo.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Oscar Gabriel Beltrán

1. En una lámina portaobjetos, agregar una gota de sangre periférica anticoagulada.
2. Con un movimiento rápido y a presión constante, extender la gota con otro portaobjetos a 45°.
3. Dejar secar, fijar con metanol por cinco minutos, teñir con Giemsa al 10 % por quince minutos, enjuagar con abundante agua y, de nuevo, dejar secar.
4. Leer con objetivo de 100x: ubicar un campo de lectura “ideal” (en el que los eritrocitos queden dispuestos uno junto a otro), dividir el campo en cuatro partes y leer en el sentido de las manecillas del reloj.
5. Recorrer la lámina mientras se cuenta el número de formas parasitarias.

El cálculo de parasitemia en frotis de sangre periférica para *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* se realiza de la siguiente manera:

**Capítulo VI.** Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA)  
(bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

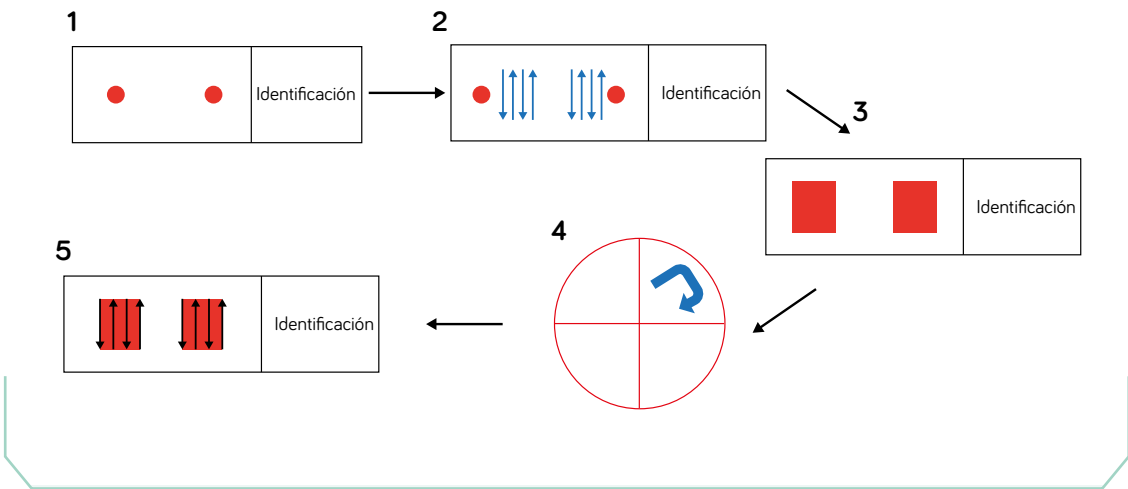
$$\text{Porcentaje de parasitemia} = \frac{\text{Eritrocitos parasitados} * 100}{\text{Eritrocitos totales en 20 campos}}$$

$$\text{Parasitemia} = \frac{(\text{Recuento total de eritrocitos} * 10E + 12) * \text{porcentaje de parasitemia}}{100}$$

En el caso de *Trypanosoma* spp., la parasitemia se debe calcular teniendo en cuenta el número de tripomastigotes observados, mientras se hace un recuento de 100 leucocitos:

$$\text{Parasitemia} = \frac{(\text{Recuento total de leucocitos} * 10E + 9) * \text{tripomastigotes por 100 eritrocitos}}{100}$$

**Gota gruesa:** Esta técnica es más sensible que el frotis sanguíneo para la detección de hemoparásitos libres, además de que permite agrupar múltiples capas de sangre (figura 87).



**Figura 87.** Realización de gota gruesa.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Oscar Gabriel Beltrán

1. En una lámina portaobjetos, agregar dos gotas de sangre periférica anticoagulada.
2. Para liberar las formas parasitarias intracelulares, extender las gotas con ayuda de otra lámina portaobjetos hasta alcanzar dos cuadrados de 1 x 1 cm.
3. Dejar secar, fijar con ayuda de un mechero, deshemoglobinizar las gotas sumergiéndolas en agua destilada, dejar secar y teñir con Giemsa al 10 % por quince minutos.
4. Dividir el campo en cuatro partes y leer en el sentido de las manecillas del reloj.
5. Realizar el recuento de parásitos teniendo como referencia el recuento de leucocitos; se deben recorrer los extendidos mientras se cuenta el número de formas parasitarias y el número de leucocitos vistos por campo microscópico.

La parasitemia se calcula teniendo en cuenta el número de formas parasitarias y de leucocitos observados:

$$\text{Parasitemia} * \mu\text{L sangre} = \frac{\text{Parásitos} * 8.000 \text{ leucocitos} * \mu\text{L sangre}}{200 \text{ leucocitos}}$$

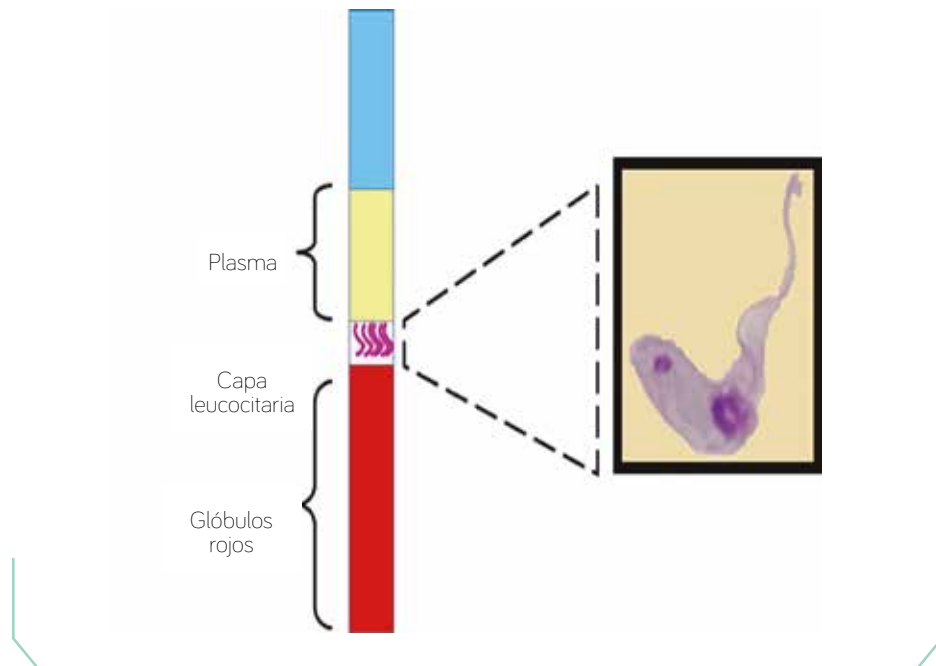
En caso de que la parasitemia sea muy alta, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Parasitemia} * \mu\text{L sangre} = \frac{500 \text{ parásitos} * 8.000 \text{ leucocitos} * \mu\text{L sangre}}{\text{Número de leucocitos}}$$

**Técnica de Woo:** Descrita como técnica de diagnóstico de filarias, permite observar los tripanosomas motiles entre el *buffy coat* y el plasma, en un capilar de microhematocrito (figura 88) (Woo, 1969).

Con el fin de confirmar la identidad del material colectado y garantizar que no se encuentre mezclado con otros hemoparásitos, se realiza un control de calidad por medio de la amplificación, por PCR, de un conjunto de marcadores específicos para cada uno de los géneros.

**Capítulo VI.** Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA)  
(bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)



**Figura 88.** Técnica de Woo.

Fuente: Archivo CMISA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: David Emigdio López Ardila

- *Anaplasma marginale*: marcador *msp4* de 850 pb con los siguientes iniciadores: *forward*: CAGAGAATTGTTTACAGGGGGCTT; *reverse*: GCT-GAACAGGAATCTTGCTCCAAG (Vidotto et al., 2006).
- *Babesia bovis*: marcador *check* de 612 pb con los siguientes iniciadores: *forward*: CCGAACTACCATCCGAAGAA; *reverse*: TCTCCGATGATTGG-TTCCAC (Guillemi et al., 2013).
- *Babesia bigemina*: marcador *sbp3* de 625 pb con los siguientes iniciadores: *forward*: AGGGGTGTGGTCAAGTTGGT; *reverse*: CTTTCATCATCAGG-GTCCGCG (Guillemi et al., 2013).
- *Trypanosoma vivax*: marcador *ctl* de 177 pb con los siguientes iniciadores: *forward*: TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA; *reverse*: GC-CATCGCCAAGTACCTCGCCGA (Cortez et al., 2009).

## Referencias

- Adamu, L., Turaki, U. A., Bukar-Kolo, Y. M., Husainy, A. Y., Dauda, I., Wakil, Y., Gulani, I. A., Abadam, F. A., & Mani, A. U. (2016). Current updates on diagnostic methodologies for tick-borne hemoparasitic diseases in equids: A review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3(2), 84-91. <https://doi.org/10.5455/javar.2016.c148>
- Adler, B., & De la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Asfour, H., & Darwish, S. (2011). Phenotypic and genotypic detection of both *mecA*- and *blaZ*-genes mediated  $\beta$ -lactam resistance in staphylococcus strains isolated from bovine mastitis. *Global Veterinaria*, 6(1), 39-50. [https://www.researchgate.net/publication/283157921-Phenotypic\\_and\\_genotypic\\_detection\\_of\\_both\\_mecA-\\_and\\_blaZ-genes\\_mediated\\_b-lactam\\_resistance\\_in\\_staphylococcus\\_strains\\_isolated\\_from\\_bovine\\_mastitis](https://www.researchgate.net/publication/283157921-Phenotypic_and_genotypic_detection_of_both_mecA-_and_blaZ-genes_mediated_b-lactam_resistance_in_staphylococcus_strains_isolated_from_bovine_mastitis)
- Balamurugan, V., Gangadhar, N. L., Mohandoss, N., Thirumalesh, S. R. A., Dhar, M., Shome, R., Krishnamoorthy, P., Prabhudas, K., & Rahman, H. (2013). Characterization of leptospira isolates from animals and humans: Phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *SpringerPlus*, 2(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-362>
- Barragán Cárdenas, D. L., & Lesmes Hernández, A. del P. (2009). "Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas": elección del mejor método [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repositoryjaveriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Benavides, E. (1982). *Biología oviposicional de la garrapata Boophilus microplus en condiciones de los Llanos Orientales de Colombia*. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).
- Benavides, E., Rodríguez, J. L., & Romero, A. (2006). Isolation and partial characterization of the montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 668-671. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05358.x>
- Bezerra da Silva, J., Carvalho, E., Hartskeerl, R. A., & Ho, P. L. (2011). Evaluation of the use of selective PCR amplification of LPS biosynthesis genes for molecular typing of *Leptospira* at the serovar level. *Current Microbiology*, 62, 518-524. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9738-7>
- Bonar, E., Wójcik, I., & Wladyka, B. (2015). Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 367-381. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1083](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1083)
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2011). Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira*

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISSA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

- spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases*, 11, artículo 338. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-338>
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2660-2666. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.11.2660-2666.1994>
- Bustos, F. (1999). Caracterización biológica y molecular de cepas del virus de Newcastle en Colombia. *Avicultores*, 53, 38-43.
- Bustos, F., & Marín, C. (1995). La enfermedad de Newcastle: generalidades y situación en Colombia. *Revista del Ceisa*, 2(2), 31-35.
- Caimi, K., Repetto, S. A., Varni, V., & Ruybal, P. (2017). *Leptospira* species molecular epidemiology in the genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 478-485. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.013>
- Caimi, K., & Ruybal, P. (2020). *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infection, Genetics and Evolution*, 81, artículo 104241. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>
- Calderón Rangel, A., Rodríguez Rodríguez, V. C., Arrieta Bernate, G. J., & Máttar Velilla, S. (2011). Prevalence of mastitis in dual purpose cattle farms in Montería (Colombia): Etiology and antibacterial susceptibility. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 19-28. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-06902011000100004](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902011000100004)
- Cameron, C. E. (2015). Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 21-41. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3)
- Cerqueira, G. M., & Picaudeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America – Characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Dastmalchi Saei, H., Ahmadi, M., Mardani, K., & Batavani, R. A. (2009). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 202-206. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.001>
- Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Sánchez, M., Herrera-León, S., Hanning, I., & Vidal, D. (2012). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 179-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.016>

- Dieser, S. A., Fessia, A. S., Ferrari, M. P., Raspanti, C. G., & Odierno, L. M. (2017). *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.007>
- Drummond, R. O., & Whetstone, T. M. (1970). Oviposition of the Gulf Coast tick. *Journal of Economic Entomology*, 63(5), 1547-1551. <https://doi.org/10.1093/jee/63.5.1547>
- Dubernet, S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271-275. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00895-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00895-9)
- El-Hadedy, D., & El-Nour, S. A. (2012). Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1), 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.01.004>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), & World Health Organization (WHO). (2006). *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
- Gao, J., Ferreri, M., Liu, X. Q., Chen, L. B., Su, J. L., & Han, B. (2011). Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5), 894-901. <https://doi.org/10.1177/1040638711416964>
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A. L., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2006). Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Veterinary Research*, 2(16), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-16>
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express*, 8(1), artículo 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>
- Gómez-Sanz, E., Ceballos, S., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., & Torres, C. (2019). Clonally diverse methicillin and multidrug resistant coagulase negative staphylococci are ubiquitous and pose transfer ability between pets and their owners. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00485>
- González, A., Borrero, R., Ruiz, J., Batista, N., Fernández, Y., Valdés, Y., & González, M. (2006). Medio EMLH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(2), 61-68. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016795003>
- González Rodríguez, A., Rodríguez Jiménez, Y., Batista Santiesteban, N., Valdés Abreu, Y., & González, M. (2003). Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(3), 146-152. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-076020030003000003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-076020030003000003)
- Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekatte, O., Zinini, F., Brisse, S., & Picardeau, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance.

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (cmisa) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

*PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), artículo e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>

Guillemi, E., Ruybal, P., Lia, V., González, S., Farber, M., & Wilkowsky, S. E. (2013). Multi-locus typing scheme for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* reveals high levels of genetic variability in strains from Northern Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.005>

Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2018). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101-106. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.003>

Ibrahim, G. M., & Morin, P. M. (2018). *Salmonella* serotyping using whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2015, 20 de octubre). Resolución 3714. Por la cual se establecen las enfermedades de declaración obligatoria en Colombia. <https://www.ica.gov.co/getattachment/3188abb6-2297-44e2-89e6-3a5dbd4db210/2015R3714.aspx>

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2016). *Situación epidemiológica de Colombia en cuanto a las enfermedades de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)*, 2016.

Janezic, K. J., Ferry, B., Hendricks, E. W., Janiga, B. A., Johnson, T., Murphy, S., Roberts, M. E., Scott, S. M., Theisen, A. N., Hung, K. F., & Daniel, S. L. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from untreated surface waters. *The Open Microbiology Journal*, 7(1), 9-19. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010009>

Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-Inderbinen, M., & Stephan, R. (2019). Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00234>

Kositanont, U., Chotinantakul, K., Phulsuksombati, D., & Tribuddharat, C. (2007). Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 288-297. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.01.012>

Koval, A. A., Brihuega, B. F., Grune Löffler, S., López, S., Saint Martin, M., Lagioia, G. G., & Insaugarat, J. R. (2020). Primer aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo Hardjo Bovis a partir de un caso clínico en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 198-201. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.002>

Krishnamoorthy, P., Satyanarayana, M. L., & Shome, B. R. (2016). Coagulase negative staphylococcal species mastitis: An overview. *Research Journal of Veterinary Sciences*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.3923/rjvs.2016.1.10>

Kumar, A., Grover, S., & Kumar Batish, V. (2013). Application of multiplex PCR assay based on uidR and flhC7 genes for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(1), 11-19. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.011>

- Kupletskaya, M. B., & Netrusov, A. I. (2011). Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology*, 80(6), 850-853. <https://doi.org/10.1134/S0026261711060129>
- Lakew, B. T., Fayera, T., & Ali, Y. M. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6), 1507-1513. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01838-w>
- Ledwaba, M. B., Gomo, C., Lekota, K. E., Le Flèche, P., Hassim, A., Vergnaud, G., & Van Heerden, H. (2019). Molecular characterization of *Brucella* species from Zimbabwe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007311>
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Liu, W.-B., Chen, J., Huang, Y.-Y., Liu, B., & Shi, X.-M. (2010). Serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility profiles of *Salmonella* from chicken farms in Shanghai. *Journal of Food Protection*, 73(3), 562-567. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.3.562>
- Lu, Y., Huang, L., Yang, T., Lv, F., & Lu, Z. (2017). Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. *LWT (Food Science and Technology)*, 80, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.044>
- Mason, W. J., Blevins, J. S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N., & Smeltzer, M. S. (2001). Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3.332-3.338. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3332-3338.2001>
- McDonald, W. L., Fry, B. N., & Deighton, M. A. (2005). Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Veterinary Microbiology*, 111(3-4), 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.012>
- Mehmeti, I., Behluli, B., Mestani, M., Ademi, A., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2016). Antimicrobial resistance levels amongst staphylococci isolated from clinical cases of bovine mastitis in Kosovo. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10), 1.081-1.087. <https://doi.org/10.3855/jidc.7912>
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Morante, H. Y., Flores, P. R., & Gamboa, R. A. (2013). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Revista Peruana de Biología*, 20(2), 159-164. <https://doi.org/10.15381/rpb.v20i2.2680>
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2.219-2.224. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.9.2219-2224.1992>
- Minst, K., Märtilbauer, E., Miller, T., & Meyer, C. (2012). Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6.957-6.962. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852>
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. (2006). Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, 52(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.002>

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (cmisa) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., & Levett, P. N. (2006). Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3.510-3.516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06>
- Munderloh, U. G., & Kurtti, T. J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental & Applied Acarology*, 7(3), 219-229. <https://doi.org/10.1007/BF01194061>
- Nagano, H., Hirochi, T., Fujita, K., Wakamori, Y., Takeshi, K., & Yano, S. (2004). Phenotypic and genotypic characterization of  $\beta$ -D-glucuronidase- positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. *Journal of Medical Microbiology*, 53(10), 1.037-1.043. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05381-0>
- Nally, J. E., Hornsby, R. L., Alt, D. P., Bayles, D., Wilson-Welder, J. H., Palmquist, D. E., & Bauer, N. E. (2018). Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. *Veterinary Microbiology*, 218, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.023>
- Narváez-Bravo, C. A., Carruyo-Núñez, G., Moreno, M., Rodas-González, A., Hoet, A. E., & Wittum, T. E. (2007). Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 17(3), 239-245. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-225920070003000005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-225920070003000005)
- Ocampo-Sosa, A. A., Agüero-Balbín, J., & García-Lobo, J. M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, 110(1-2), 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.007>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2019). *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*. <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>
- Pacheco-Montealegre, M., Patiño, R. E., Torres, L., Jiménez, S., Rodríguez, J. L., & Caro-Quintero, A. (2017). The draft genome of *Brucella abortus* strain Ba col-B012, isolated from a dairy farm in Nariño, Colombia, bring new insights into the epidemiology of biovar 4 strains. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), artículo 89. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0299-2>
- Palomares Velosa, J. E., & Rodríguez Bautista, J. L. (2011). Fluctuación en el comportamiento del perfil de resistencia a acaricidas piretroides sintéticos (PS) y organofosforados (OP) de la cepa Palma de Vino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En Parasitología. Abstracts, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(3), 500-510. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324709>
- Pavan, M. E., Brihuega, B., Pettinari, M. J., & Cairó, F. (2011). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(4), 251-255. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000400003>
- Pavan, M. E., Cairó, F., Brihuega, B., & Samartino, L. (2008). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.03.004>

- Philip, N., Garba, B., & Neela, V. K. (2018). Long-term preservation of *Leptospira* spp.: Challenges and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(13), 5427-5435. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9047-9>
- Polo, L., Mañes-Lázaro, R., Olmeda, I., Cruz-Pio, L. E., Medina, A., Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1603-1614. <https://doi.org/10.1111/jam.13465>
- Portner, D. C., Leuschner, R. G. K., & Murray, B. S. (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*, 54(3), 265-270. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.03.002>
- Postic, D., Riquelme-Sertour, N., Merien, F., Perolat, P., & Baranton, G. (2000). Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: Application to *L. meyeri*. *Research in Microbiology*, 151(5), 333-341. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00156-X)
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Puche, R., Ferrés, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., & Iraola, G. (2018). *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(2), 513-517. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>
- Pumipuntu, N., Kulpeanprasit, S., Santajit, S., Tunyong, W., Kong-ngoen, T., Hinthong, W., & Indrawattana, N. (2017). Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Veterinary World*, 10(7), 721-726. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.721-726>
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., Wyder, A., & Graber, H. U. (2013). Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), artículo 53. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-53>
- Rato, M. G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L. M., Vilela, C. L., & Santos-Sanches, I. (2013). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 161(3-4), 286-294. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.043>
- Ravindra, P. V., Tiwari, A. K., Ratta, B., Chaturvedi, U., Palia, S. K., & Chauhan, R. S. (2009). Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis. *Virus Research*, 141(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.008>
- Reinoso, E. B., Lasagno, M. C., & Odierno, L. M. (2015). Genetic patterns of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 108-111. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.001>

## Capítulo VI. Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISSA) (bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

- Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., & Yu, H. (2018). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, artículo 5416725. <https://doi.org/10.1155/2018/5416725>
- Rezasoltani, S., Dabiri, H., Khaki, P., Nejad, M. R., Karimnasab, N., & Modirrousta, S. (2015). Characterization of *Leptospira interrogans* serovars by polymorphism variable number tandem repeat analysis. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(10), artículo e22819. <https://doi.org/10.5812/jjm.22819>
- Romaniuk, J. A. H., & Cegelski, L. (2015). Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0024>
- Rosa, A., & Ribicich, M. (2012). *Parasitología y enfermedades parasitarias en veterinaria* (1.ª ed). Hemisferio Sur.
- Sánchez Bonilla, M. del P., Gutiérrez Murillo, N. P., & Posada Almanza, I. J. (2018). Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 226-239. <https://doi.org/10.15381/rivepv29i1.14084>
- Souza, R. F. S., Jardin, J., Cauty, C., Rault, L., Bouchard, D. S., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., Monedero, V., Seyffert, N., Azevedo, V., Le Loir, Y., & Even, S. (2017). Contribution of sortase SrtA2 to *Lactobacillus casei* BL23 inhibition of *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, 12(3), artículo e0174060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174060>
- Stefanello, R. F., Machado, A. A. R., Pasqualin Cavalheiro, C., Bartholomei Santos, M. L., Nabeshima, E. H., Copetti, M. V., & Fries, L. L. M. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. *LWT (Food Science and Technology)*, 89, 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>
- Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the bio-control agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*, 94, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., & Goarant, C. (2018). Biodiversity of environmental *Leptospira*: Improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>
- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., & Goarant, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, 4(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Titze, I., & Krömker, V. (2020). Antimicrobial activity of a phage mixture and a lactic acid bacterium against *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/vetsci7010031>

- Tomazi, T., Freu, G., Gomes Alves, B., De Souza Filho, A. F., Heinemann, M. B., & Dos Santos, M. V. (2019). Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. *PLoS ONE*, *14*(10), artículo e0223719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223719>
- Torres Higuera, L. D., Jiménez Velásquez, S. del C., Rodríguez Bautista, J. L., & Patiño Burbano, R. E. (2019). Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, *51*(3), 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.002>
- Torres Higuera, L. D., Ortiz Ortega, D., Rodríguez Bautista, J. L., & Patiño Burbano, 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. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol9\\_num2\\_art:120](https://doi.org/10.21930/rcta.vol9_num2_art:120)
- Vidotto, M. C., Kano, S. F., Gregori, F., Headley, S. A., & Vidotto, O. (2006). Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1a* and *mcp4* genes. *Journal of Veterinary Medicine, Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *53*(9), 404-411. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00984.x>
- Villacís Rivas, G., Escudero Sánchez, G., Cueva Castillo, F., & Luzuriaga Neira, A. (2014). Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador. *Cedamaz*, *4*(1), 86-90. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/241/224>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M. K. N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A. A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5), artículo e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Wanecka, A., Król, J., Twardoń, J., Mrowiec, J., Bania, J., Korzeniowska-Kowal, A., & Tobiasz, A. (2018). Characterization of a genetically distinct subpopulation of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from milk of cows with intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, *214*, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.004>
- Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick Jr., E. J., Hubbard, G., & Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 4120-4128. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0>
- Woo, P. T. K. (1969). The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, *47*(5), 921-923. <https://doi.org/10.1139/z69-150>
- Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N., Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macías-Rioseco, M., Menéndez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., ... Buschiazzi, A. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(9), artículo e0006694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>

**Capítulo VI.** Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA)  
(bacterias y virus – ectoparásitos y hemoparásitos)

Zhang, J., Liu, Q., Chen, W., Du, G., & Chen, J. (2016). Short communication: Protection of lyophilized milk starter *Lactobacillus casei* Zhang by glutathione. *Journal of Dairy Science*, 99(3). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9540>

Zhao, G., & Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333-338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>

Zuerner, R. L. (2005). Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Current Protocols in Microbiology*, 00(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e01s00>



## Capítulo VII

↑ *Dentiscutata heterogama*, CMIB

213

### Documentación

Juan Camilo Ovalle Másmela  
Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Autor de correspondencia: Juan Camilo Ovalle Másmela; correo electrónico: [jovallem@agrosavia.co](mailto:jovallem@agrosavia.co)

Los microorganismos, los genes y toda la información relacionada con estos son la materia prima para el avance de la biotecnología, la investigación y el desarrollo de las ciencias de la vida. La World Federation for Culture Collections (WFCC) recomienda que todas las colecciones documenten, sistematicen y publiquen un catálogo en línea o impreso con regularidad. Este catálogo debe tener como finalidad difundir información sobre las cepas conservadas, para promover su uso científico e industrial. Sin embargo, cabe resaltar que, a la fecha, de acuerdo con las estadísticas disponibles, menos de una sexta parte de las colecciones registradas en la CCINFO (Culture Collection Information Database) publican su catálogo en línea, lo que dificulta enormemente la visibilidad y, por tanto, la accesibilidad a los microorganismos que conforman estas colecciones (Wu et al., 2013).

Para profundizar este capítulo, es importante mencionar que diversos estudios han descrito la existencia de una abundancia y una alta diversidad de microorganismos en el planeta. Se estima que el total de células bacterianas sobre la Tierra es de  $4$  a  $6 \times 10^{30}$ , valor que supera el número de estrellas estimadas en el universo ( $1 \times 10^{30}$ ) (Antunes et al., 2016). Adicionalmente, cabe mencionar que los nichos microbianos no solo se limitan a océanos, suelos, filósfera y aguas, sino que también se encuentran en nuestro propio cuerpo, con una proporción mayor de 10:1 y 100:1 que nuestras propias células y genes, respectivamente (Antunes et al., 2016).

La alta diversidad genética y el *fitness* biológico —o aptitud— han llevado a que los microorganismos desarrollen la capacidad de vivir en una amplia diversidad de hábitats, incluyendo ambientes extremos (Locey & Lennon, 2016), donde varios de estos microorganismos están involucrados en procesos importantes, como los ciclos biogeoquímicos, los procesos de biorremediación,



la producción de antibióticos y la producción de alimentos, entre otros (Caplice & Fitzgerald, 1999; Falkowski et al., 2008; Harekrushna & Kumar, 2012; Rokem et al., 2007).

Con base en lo anterior, el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), adoptado en 1992, destacó la necesidad e importancia de llevar a cabo estudios científicos más exhaustivos sobre la diversidad de microorganismos con potencial de uso y aprovechamiento en las industrias farmacéutica, ambiental, cosmética y alimentaria, entre otras, con lo cual se ha logrado que en el último medio siglo diversos géneros microbianos hayan sido empleados para el desarrollo de productos biológicos que aumentan la disponibilidad de nutrientes esenciales y de fitohormonas que favorecen el crecimiento de las plantas y aumentan la resistencia a enfermedades más amigablemente con el medio ambiente y de forma segura para la salud (Qu et al., 2020).

Otro tipo de microorganismos o sus metabolitos han sido empleados por su capacidad de producir compuestos volátiles y no volátiles o de desarrollar mecanismos de acción que contrarrestan el aumento de patógenos y plagas (Abd-Elgawad, 2020; Fira et al., 2018; Lemos Junior et al., 2020; Liu et al., 2013). También están siendo empleados para la obtención de bioetanol como alternativa de productos petroquímicos, pues es más eficiente en términos de rendimiento y costo de producción (Basso et al., 2008). Asimismo, otro sinfín de microorganismos han sido empleados para la obtención o producción de enzimas para diversas aplicaciones en diferentes áreas de la biotecnología (Antunes et al., 2016).

En las últimas décadas, el desarrollo biotecnológico se ha favorecido en gran medida por la revolución de la biología molecular, que aumentó significativamente la capacidad de obtener y modificar los recursos biológicos para usarlos en beneficio de la humanidad. En este escenario, la secuenciación y análisis de las funciones de los genes ha tenido efectos sin precedentes, no solo en el uso de varios grupos de microorganismos, sino en la generación de una gran cantidad de información a partir de los diferentes estudios científicos que se realizan a nivel mundial (Claros, 2003; Colección Española de Cultivos Tipo [CECT], 2016). Es por esto que los gobiernos, en asociación con las industrias, además de hacer grandes inversiones en la conservación e investigación del recurso biológico, también han hecho énfasis en la adecuada documentación, organización, validación y disponibilidad de la información (Noreña-P. et al., 2018).

La documentación del recurso biológico hace referencia al conjunto de procedimientos, protocolos y técnicas establecidas para el manejo y uso de las

diferentes colecciones de microorganismos, así como a los procesos de investigación, descripción y potencial de uso. Los grandes esfuerzos en torno a la conservación e investigación también han llevado a los gobiernos y a las organizaciones privadas a promover el uso de los sistemas de información, para que los resultados generados sigan impulsando el desarrollo biotecnológico, en busca de un crecimiento sostenible y sustentable de los diferentes sectores productivos (Durães et al., 2013).

En este sentido, la wfcc, desde 1960, en cabeza del Dr. Skerman, creó el World Data Centre for Microorganisms (wDCM), y en 1972, el Dr. Skerman, junto con su equipo de trabajo, lanzó la primera publicación de una base de datos de colecciones biológicas (Ma et al., 2011). Actualmente, las colecciones de recursos biológicos se registran ante la wfcc y, a su vez, se asocian a la red de datos de información biológica. En consecuencia, el wDCM constituye el directorio de todas las colecciones biológicas de microorganismos registradas a nivel mundial, y se encuentra disponible en línea en la dirección [www.wdcm.org](http://www.wdcm.org) (figura 89). El wDCM contiene información y estadísticas respecto al número de colecciones biológicas por país o región, así como sobre el número de microorganismos registrados en las diferentes bases de datos (figura 90).



Figura 89. Sitio web del World Data Centre for Microorganisms (wDCM): [www.wdcm.org](http://www.wdcm.org).



Figura 90. Información suministrada por el wdcM: [www.wdcM.org/databases.html](http://www.wdcM.org/databases.html)

La creación del Global Catalogue of Microorganisms (GCM) permite dar a conocer de manera fácil y fiable parte del recurso biológico registrado, lo que facilita no solo la difusión, sino también el intercambio de información relacionada con sus características (Wu et al., 2013). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, tanto la wfcc como otras instituciones siguen trabajando en robustecer y ampliar el acceso a la información. Así, a la fecha, se ha logrado que 68 colecciones mantengan actualizado su catálogo en línea y que otras 52 hayan contado con catálogos publicados en algún momento; sin embargo, aún falta que un número considerable de colecciones se registren y fortalezcan la documentación de su recurso biológico.

Entre las colecciones de microorganismos de Latinoamérica que están registradas y cuentan con catálogos en línea se encuentra la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM), del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile, que, al igual que AGROSAVIA, cuenta con un banco de recursos microbianos ([www.inia.cl/red-de-bancos-de-germoplasma](http://www.inia.cl/red-de-bancos-de-germoplasma)) cuyo fin es preservar, *ex situ*, microorganismos con interés y potencial de uso en el sector agrícola. En su sitio web se encuentra disponible el catálogo de microorganismos (figuras 91 y 92).



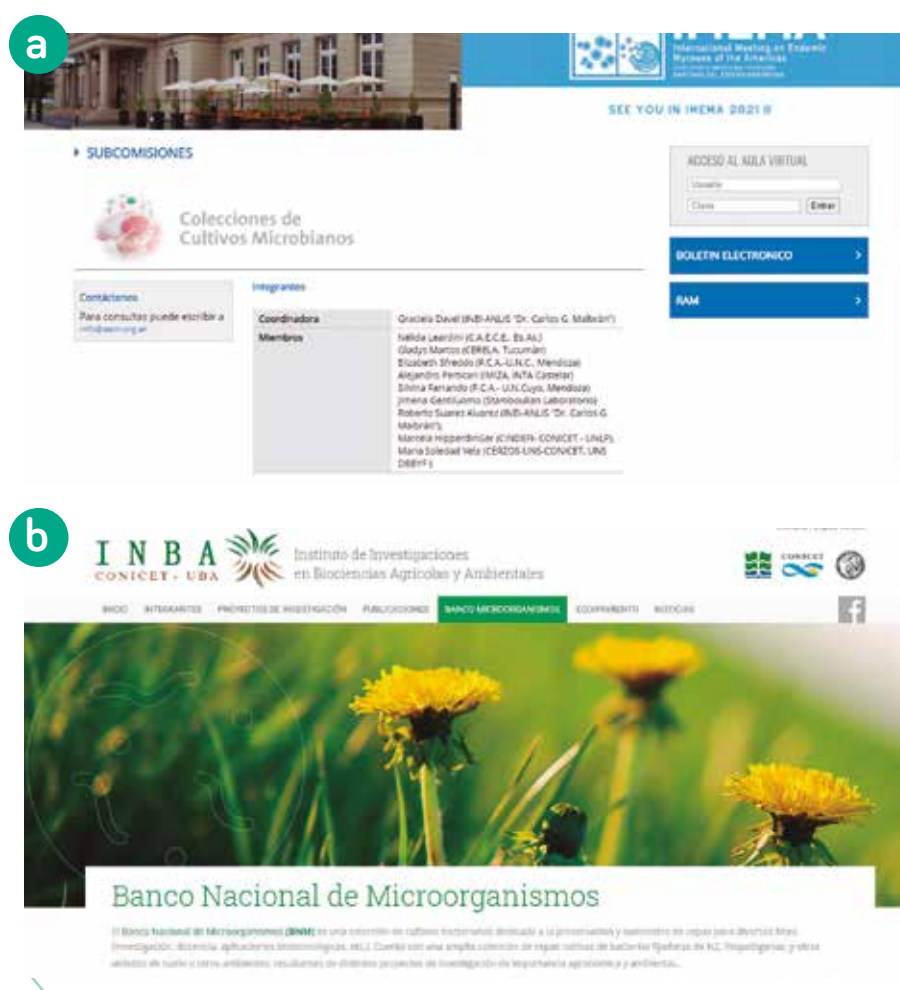
Figura 91. Página web de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM): [www.cchrgm.cl](http://www.cchrgm.cl).



Figura 92. Catálogo de microorganismos registrados en la CChRGM: [www.cchrgm.cl/catalogo-1](http://www.cchrgm.cl/catalogo-1).

En este sitio web se encuentran listados los microorganismos que hacen parte de la colección, los cuales se encuentran identificados con un código, tal como se muestra en la figura 92 para el caso de accesiones de *Botrytis* sp. Además, para cada código se despliega información relacionada con la clasificación taxonómica, datos de colecta, condiciones para su crecimiento (medio de cultivo) y el método de conservación.

Asimismo, algunas de las colecciones de Argentina ya registradas ante la WFCC cuentan con página web, su catálogo está en el WDCM y las direcciones de correo se encuentran disponibles para realizar solicitudes de cepas (figura 93).



**Figura 93.** Sitios web de colecciones de cultivos microbianos de Argentina. *a*. Asociación Argentina de Microbiología (AAM): [www.aam.org.ar/index.php](http://www.aam.org.ar/index.php); *b*. Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA): [www.inba.agro.uba.ar/banco.html](http://www.inba.agro.uba.ar/banco.html)



The image shows a web form titled 'Contacto' (Contact) on the AGROSAVIA website. The form is located on the right side of the page, with a navigation menu on the left. The menu includes items like 'Qué hacemos', 'Productos y Servicios', 'Noticias', 'Nosotros', 'Atención al Usuario', and 'Biblioteca'. The 'Contacto' form has several input fields: 'Nombre' (Name), 'Correo' (Email), 'Teléfono' (Phone), and 'Ubicación' (Location). Below these fields, there are two dropdown menus for selecting a 'Líder' (Leader) from the 'Banco de Germoplasma' (Germoplasma Bank). The first dropdown is labeled 'E necesita comunicarse con un Líder específico por favor seleccionarlo' (You need to communicate with a specific leader, please select one). The second dropdown is labeled 'E necesita comunicarse con un Líder específico por favor seleccionarlo' (You need to communicate with a specific leader, please select one). Below the dropdowns is a large text area labeled 'Mensaje' (Message). At the bottom of the form, there is a small text box containing a privacy policy statement: 'Autorizo expresamente a AGROSAVIA para utilizar mi información personal en el trámite de esta petición, en los términos establecidos en la Ley 1581 de 2012, el Decreto 1377 de 2013 y conforme a los lineamientos establecidos en la Política para la Protección de Datos Personales.' (I expressly authorize AGROSAVIA to use my personal information in the processing of this request, in the terms established in Law 1581 of 2012, Decree 1377 of 2013 and in accordance with the guidelines established in the Policy for the Protection of Personal Data.)

**Figura 95.** Solicitud de cepas al Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA: [www.agrosavia.co/nosotros/bancos-de-germoplasma/contacto](http://www.agrosavia.co/nosotros/bancos-de-germoplasma/contacto).

A nivel nacional, se cuenta con el Sistema de Información Biológica (SiB Colombia: [www.sibcolombia.net/el-sib-colombia](http://www.sibcolombia.net/el-sib-colombia)), que constituye y promueve la red nacional de datos abiertos sobre biodiversidad. Esta iniciativa fue creada con el Decreto 1603 de 1994 como parte del proceso de creación del Sistema Nacional Ambiental (SINA), establecido en la Ley 99 de 1993 como nodo oficial del país en la Global Biodiversity Information Facility (GBIF). La misión del SiB es brindar acceso abierto a información sobre la diversidad biológica del país para la construcción de una sociedad sostenible, además de facilitar la publicación en línea de datos e información sobre biodiversidad y promover su uso en una amplia variedad de audiencias. En este sentido, AGROSAVIA está en proceso de publicación de las diferentes colecciones de microorganismos.

Para la publicación de los datos de las diferentes colecciones, AGROSAVIA, siguiendo las indicaciones del SiB, desarrolló una plataforma tecnológica basada en el estándar Darwin Core (DwC) (Ortega Andrade & Guevara Vega, 2017; Rivera-Gutiérrez & Suárez Mayorga, 2005). La plataforma se estandarizó de acuerdo con los requerimientos y procesos de cada colección o grupo microbiano, lo que ha permitido el fortalecimiento de la publicación y gestión de los metadatos.

Darwin Core es un estándar para compartir datos sobre biodiversidad en un lenguaje normalizado o común creado para publicar y documentar datos sobre registros biológicos (Wieczorek et al., 2012). Está conformado por 169

elementos, de los cuales 5 son obligatorios (ID del registro biológico, base del registro, código de la institución, código de la colección y número de catálogo). En algunos elementos, hay asociados unos vocabularios controlados o normas ISO para su diligenciamiento, como, por ejemplo, la fecha. También se dan indicaciones para la creación de códigos de identificación, tanto de la colección como de cada accesión. En este sentido, la colección está avanzando en la creación de códigos QR para etiquetar e identificar cada accesión (número de catálogo), y estos pueden ser escaneados y leídos incluso por teléfonos inteligentes.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura —administrados por AGROSAVIA— son “colecciones de servicios” por ser respaldados directamente con fondos del Gobierno, cumplen un rol importante al coleccionar, mantener y proveer cepas viables y de calidad, y su objetivo primordial es el suministro de cultivos autenticados a todos los que lo soliciten. Conforme a esto, AGROSAVIA implementó la herramienta informática BioloMICS, que permite la creación de bases de datos especializadas para el almacenamiento de información biológica y científica. Con este sistema, AGROSAVIA creó e implementó la plataforma desarrollada en Darwin Core de cada una de las colecciones (figura 96).

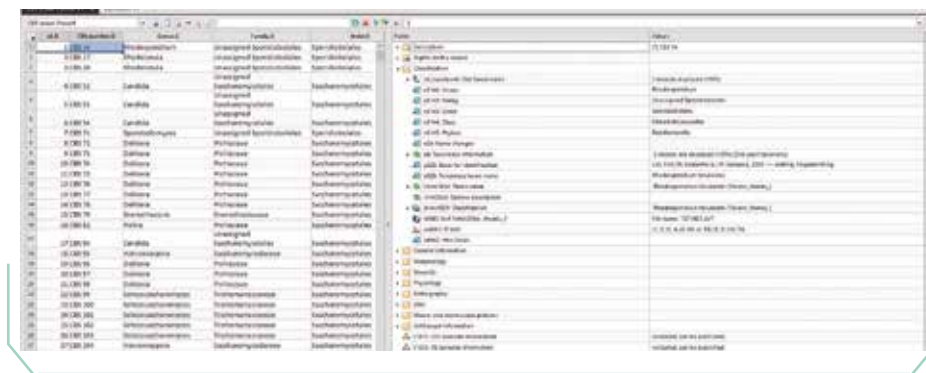


Figura 96. Sistema de información BioloMICS.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

BioloMICS es un sistema completamente dinámico en el cual se puede almacenar, analizar y publicar en línea información del recurso biológico depositado, además de que permite conectarse con otras bases de datos de interés. Es ampliamente usado en diferentes países del mundo, como España, Francia, Rusia, China, Estados Unidos, Argentina, Brasil y Colombia. AGROSAVIA adquirió la versión 6.1 en 2003, pero actualmente cuenta con la versión 11, que tiene una estructura completamente flexible en la cual los usuarios pueden crear

una tabla por accesión y, dentro de cada tabla, crear los campos disponibles para almacenar la información que los curadores o investigadores consideren importante. Estos campos corresponden principalmente a un espacio donde se introducen los datos generados a partir de las actividades de colecta o aislamiento, conservación, caracterización, identificación e investigación. Los campos pueden ser modificados según se requiera, ya sea eliminándolos, adicionando otros o disponiéndolos en carpetas o subcarpetas. Las modificaciones realizadas en la base de datos quedan archivadas como un registro y se pueden deshacer o rehacer según sea necesario.

Para el caso de la información generada a partir de la actividad de colecta, cada accesión tiene registrado el código de identificación, la fecha en la cual se realizó la colecta, la entidad responsable, el lugar donde se realizó el aislamiento (georreferenciación), el sustrato del cual fue extraído y la fecha de ingreso al banco. En conservación, incluye la fecha de almacenamiento, el método de conservación, el número de copias o réplicas, el lugar de almacenamiento y su ubicación. En cuanto a la caracterización, esta se clasifica en morfológica, fisiológica y molecular. Adicionalmente, el sistema permite crear enlaces, cargar imágenes y secuencias, analizar imágenes de geles y realizar mediciones celulares, además de que cuenta con una serie de herramientas que facilitan el mayor aprovechamiento de la información depositada en la base de datos (Robert et al., 2011).

Es importante tener en cuenta que un sistema de documentación no solo es necesario para la recuperación de datos: actualmente, la documentación del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA se dirige a la obtención, el procesamiento y el análisis de la información generada en las actividades de colecta, conservación, caracterización y uso potencial de las accesiones conservadas. A propósito, a continuación se presentan algunos elementos que apoyan el proceso documental.

*Bacillus* sp., CMIB →



## Pasaporte de accesoión

La información generada por un banco de germoplasma es de gran valor científico, y una primera parte de esta información está contenida en los pasaportes de cada accesoión biológica. Es necesario mantener esta información actualizada, ya que permite realizar las actividades de la colección de manera eficiente (Painting et al., 1995). Cuando una accesoión va a ingresar a cualquiera de las colecciones de microorganismos de AGROSAVIA, debe contar con un pasaporte, el cual es diligenciado por el curador a partir de la información suministrada por el colector (GA-F-330: "Pasaporte de accesoión de microorganismos de bancos de germoplasma"). Este formulario contiene información básica de la colecta, así como algunos elementos relevantes en la caracterización de cada nueva cepa (figura 97). Una vez completada la información de registro, el curador le asigna un código a la accesoión de acuerdo con las características del microorganismo, además de un consecutivo que señala el número de ingreso a cada colección en particular.

 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria		GESTIÓN DE LA AGENDA CORPORATIVA		CÓDIGO: GA-F-330
		PASAPORTE DE ACCESIÓN DE MICROORGANISMOS DE BANCOS DE GERMOPLASMA		VERSIÓN: 00
				FECHA DE APROBACIÓN DEL CAMBIO: 2019-01-08
Consecutivo de registro:	Número de cepa		Código de accesoión:	Número de identificación para la colección
Fecha de ingreso:	Fecha en que se registra el microorganismo en la colección	Descripción:	Resumen de las atributos del microorganismo	
<b>DATOS DE IDENTIFICACIÓN</b>				
Género		Especie	Sinónimos	Nombre del identificador/nombre del
ej. <i>Rhizoglyphus</i>		ej. <i>R. florentinus</i>	Número o código asignado por el identificador	Personal que realizó la identificación y caracterización del microorganismo/ persona que solicitó el ingreso a la colección
<b>DATOS DE COLECCIÓN</b>				
Instituto colector		Nombre del colector	Fecha de recolección	
Organismo/Ingeniero/Universidad		Empresa/Organización/Universidad/Persona	Fecha en que se realizó la recolección de la muestra	

**Figura 97.** Formato de AGROSAVIA "Pasaporte de accesoión de microorganismos de bancos de germoplasma (GA-F-330)".

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

La información contenida en el pasaporte debe mantenerse actualizada, ya que le permite al curador de la colección una correcta toma de decisiones, el establecimiento de prioridades para el uso adecuado de los recursos y un manejo eficiente de las accesoiones biológicas (Painting et al., 1995).

Es importante resaltar que el código asignado a la accesoión en el pasaporte debe estar asociado con un eficiente sistema numérico, pues, de lo contrario, podría causar problemas desastrosos tanto en el orden y la ubicación de las

accesiones como en el manejo de la información, así que se recomienda utilizar un sistema de numeración único (Engels & Visser, 2007).

Otro aspecto relevante en el diligenciamiento de un pasaporte es mantener el nombre científico de la accesión, ya que este es reconocido internacionalmente, lo que facilita la publicación de datos en cualquier idioma. Adicionalmente, esta información es necesaria en el eventual caso de una reclasificación del grupo taxonómico o un cambio de nomenclatura (Kameswara Rao et al., 2007).

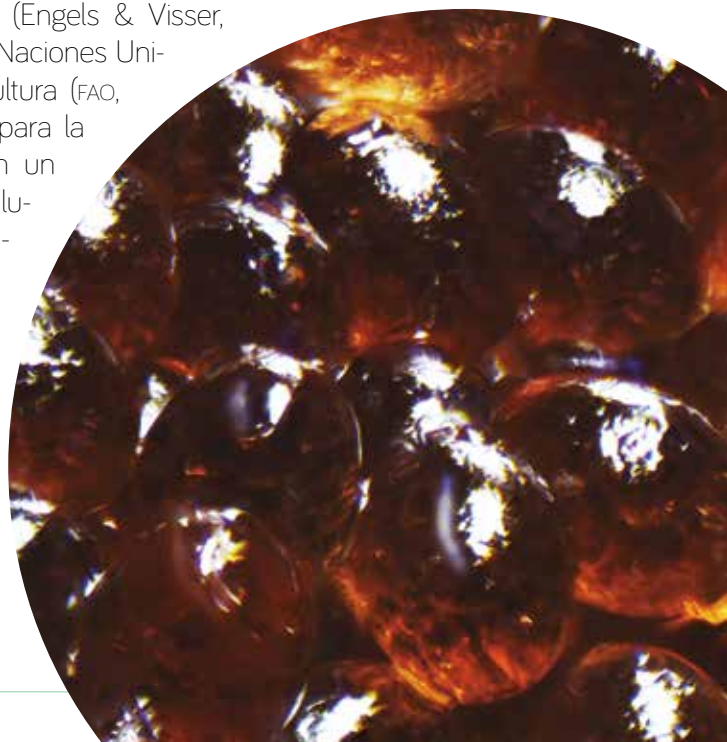
## Formato de entrega

El formato de entrega de microorganismos, como su nombre lo indica, es un documento que sirve para llevar el registro del material biológico que se entrega tanto a personal interno como externo o a instituciones nacionales o internacionales. Este documento contiene datos básicos del microorganismo y elementos que comprueban la autenticidad de la cepa entregada, con el fin de hacer un proceso controlado del material biológico en términos de pureza, viabilidad y autenticidad. Es recomendable, siempre que se haga entrega de una cepa microbiana, contar con este documento, que forma parte de los procesos de gestión de la calidad de cualquier colección.

## Hoja de vida

Los datos del pasaporte no son los únicos que se registran en relación con una accesión. Datos de otra índole, producto de la caracterización y evaluación realizada por los colectores, también son de importancia en los procesos de documentación (Engels & Visser, 2007). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2014), son tres las normas básicas para la administración de la información en un banco de germoplasma. En primer lugar, el uso de los pasaportes, que contienen la información primaria de las accesiones biológicas; en segundo lugar, el uso de bases de datos para

Huevos de garrapata →  
*Rhipicephalus (B.) microplus*, CMIB



el registro de la información obtenida, y en tercer lugar, tener un sistema de información dinámico para la actualización de los cambios generados por la gestión de la colección.

De acuerdo con lo anterior, es importante llevar un registro de la información secundaria de la accesión obtenida ya sea por suministro del colector o depositante o por los procesos de caracterización e investigación del banco. Es por ello por lo que el formato de hoja de vida es un formulario que contiene la información detallada de cada accesión. Cuando una cepa va a ser ingresada a cualquiera de las colecciones biológicas, el depositante debe diligenciar este documento, ya que le permite al curador de la colección conocer de primera mano no solo las condiciones de toma de muestra y aislamiento, sino también sus características fisiológicas, bioquímicas y genotípicas, lo que hace que este pueda garantizar la viabilidad de dicha cepa. La información suministrada queda a criterio del depositante, pero es necesario contar con una información mínima, como lugar de colecta, tipo de muestra, caracterización fisiológica e identificación molecular, de tal manera que se pueda hacer control de calidad al material recibido.

Por otro lado, este formato se entrega cuando una cepa es solicitada, ya que detalla diversas características necesarias para la reactivación, crecimiento y caracterización de los microorganismos; todo ello, en virtud de que la cepa tenga el manejo adecuado de acuerdo con las especificaciones establecidas por los curadores de las colecciones.



## Sistema de etiquetado e identificación de las accesiones

Los códigos de barras y QR vienen siendo utilizados con más frecuencia para el manejo y gestión de inventarios de colecciones biológicas, ya que facilitan la actualización de la información de cada accesión en tiempo real (Painting et al., 1995). El Banco de Germoplasma de Microorganismos está implementando actualmente el uso de etiquetas resistentes a la criogenización, las cuales también cuentan con códigos QR. Estas etiquetas, aparte de ser resistentes a las bajas temperaturas, garantizan que la información grabada no se diluya por la humedad o por el nitrógeno líquido. El uso de etiquetas promueve una correcta identificación de las cepas y disminuye el error en la información allí contenida. Además, el uso de códigos QR facilita el manejo de las accesiones por parte de los curadores en cuanto a la identidad del microorganismo, la actualización del inventario y la consulta de la información relacionada con cada cepa.

Para la identificación de las accesiones de las colecciones de microorganismos, se cuenta con un código unificado construido sobre parámetros como tipo de microorganismo (tabla 12), colección a la que pertenece (tabla 13), género (tabla 14) y consecutivo asignado de acuerdo con el orden de ingreso en cada colección (tabla 15).

**Tabla 12.** Código asignado según el tipo de microorganismo

Código	Tipo de microorganismo
B	Bacteria
H	Hongo
L	Levadura
P	Hemoparásito
M	Micorriza
V	Virus
C	Célula
G	Garrapata

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

**Tabla 13.** Código asignado según la colección

Código	Banco
1	Biofertilizantes
2	Control Biológico
3	Nutrición Animal
4	Salud Animal

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

**Tabla 14.** Código asignado según el género

Código	Género
01	<i>Ruminococcus</i>
02	<i>Streptococcus</i>
03	<i>Enterococcus</i>
04	<i>Staphylococcus</i>
05	<i>Megasphaera</i>
06	<i>Fibrobacter</i>
07	<i>Bacillus</i>
08	<i>Escherichia</i>
09	<i>Eubacterium</i>
10	<i>Klebsiella</i>
11	<i>Carnobacterium</i>
12	<i>Prevotella</i>
13	<i>Butyrivibrio</i>
14	<i>Pseudobutyrvibrio</i>
15	<i>Lactobacillus</i>
16	<i>Pediococcus</i>
17	<i>Lactococcus</i>
18	<i>Leuconostoc</i>
00	Sin identificar

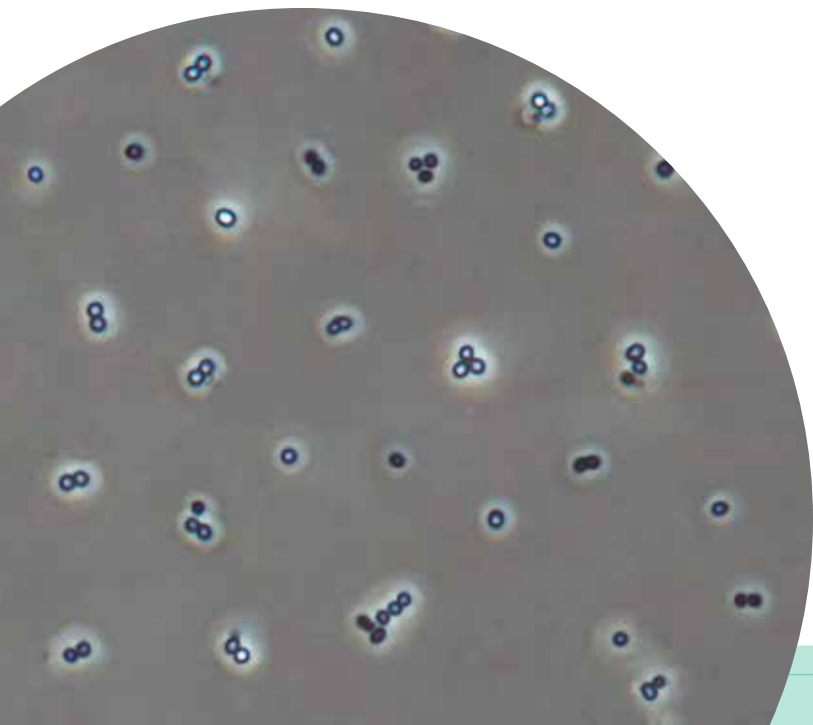
Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

**Tabla 15.** Código asignado según el consecutivo

Consecutivo
001
002
003
004

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

▼ BAR *Ruminococcus flavefaciens*,  
 accesión de CMINA



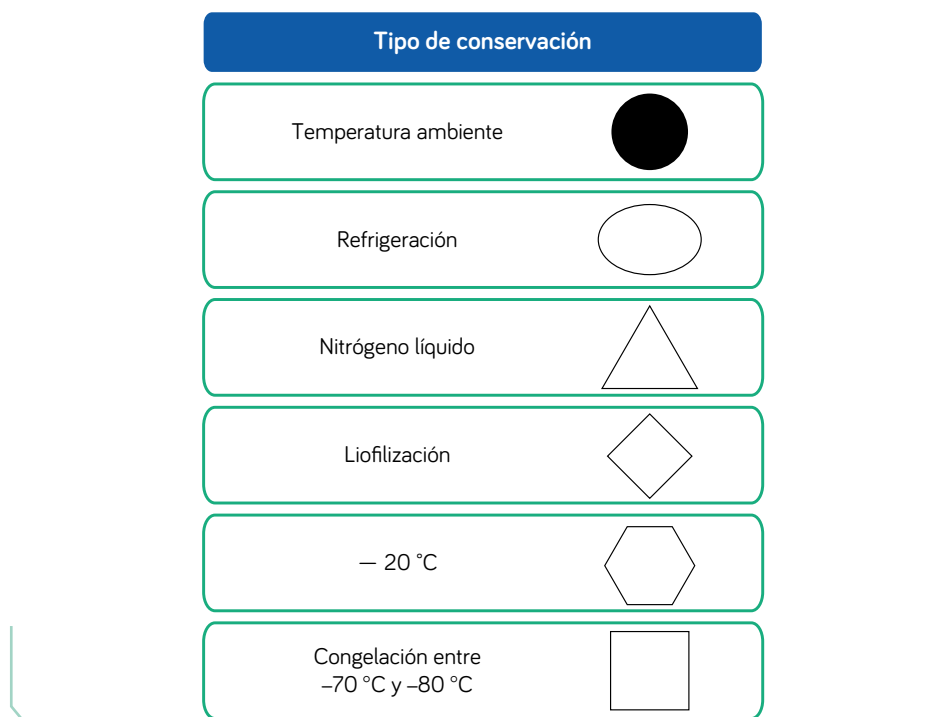
Como resultado de la asignación de los códigos de las tablas 12-15, en la tabla 16 se presenta un ejemplo de su uso.

**Tabla 16.** Ejemplo de identificación (ID) para la generación de códigos QR con accesiones del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA

ID	Nombre científico
B302001	<i>Streptococcus bovis</i>
B313001	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
B301001	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
B306001	<i>Fibrobacter succinogenes</i>

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

Junto con la unificación del código, el Banco de Microorganismos de Germoplasma de AGROSAVIA observó la importancia de adicionar un símbolo que permitiera identificar la procedencia de la accesión de acuerdo con el sistema de conservación (figura 98).



**Figura 98.** Simbología de AGROSAVIA asociada al método de conservación del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

La etiqueta final que ha empezado a identificar las accesiones depositadas bajo los diferentes sistemas de conservación se muestra a continuación (figura 99).



**Figura 99.** Modelo de rótulo de AGROSAVIA de accesiones definitivo.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Los criterios anteriormente descritos con relación a la documentación de los recursos biológicos de las colecciones de microorganismos de AGROSAVIA buscan constituir un derrotero para la estandarización de los diferentes procesos documentales en cuanto a registro, conservación y caracterización de las distintas colecciones de microorganismos, lo que permite que dichos criterios sean incorporados a las actividades rutinarias de conservación y gestión del recurso biológico de organizaciones tanto privadas como públicas. El objetivo principal de este capítulo fue, pues, mostrar cómo el Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA ha diseñado una estrategia de captura, organización y elaboración de bases de datos que garanticen el correcto almacenamiento de la información biológica, teniendo en cuenta las recomendaciones dadas por el SiB Colombia.

Por otro lado, es importante resaltar que, aunque el Darwin Core es el formato base para el almacenamiento de la información de las diferentes accesiones biológicas, se debe realizar un trabajo en red con las diferentes colecciones microbianas de la nación para generar un formato especializado en microorganismos que abarque descriptores que guarden relación con los diferentes tipos de organismos microbianos depositados en los diferentes repositorios, para luego ser consultados abiertamente por los diferentes investigadores del país.

Finalmente, debemos resaltar la importancia de mantener una colección correctamente documentada, que permita mantener una trazabilidad de los procesos de conservación y caracterización, en aras de garantizar el origen, la autenticidad y la calidad del material biológico colectado y conservado.

## Referencias

- Abd-Elgawad, M. M. M. (2020). Optimizing biological control agents for controlling nematodes of tomato in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, artículo 58. <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-020-00252-x>
- Antunes, A., Stackebrandt, E., & Lima, N. (2016). Fueling the bio-economy: European culture collections and microbiology education and training. *Trends in Microbiology*, 24(2), 77-79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.11.010>
- Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1155-1163. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)
- Claros, G. (2003). Aproximación histórica a la biología molecular a través de sus protagonistas, los conceptos y la terminología fundamental. *Panacea*, 4(12), 168-179. [https://www.tremedica.org/wp-content/uploads/n12\\_tribuna\\_GClaros.pdf](https://www.tremedica.org/wp-content/uploads/n12_tribuna_GClaros.pdf)
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (2016). *Memorias: III Certificado de Especialización en Conservación y Control de Cepas Microbianas* [manuscrito inédito].
- Durães, R., Carrasco, L., Smith, T. B., & Karubian, J. (2013). Effects of forest disturbance and habitat loss on avian communities in a Neotropical biodiversity hotspot. *Biological Conservation*, 166, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.07.007>
- Engels, J. M. M., & Visser, L. (eds.). (2007). *Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma*. Bioersity International. [https://www.bioersityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Gu%C3%ADa\\_para\\_el\\_manejo\\_eficaz\\_de\\_un\\_banco\\_de\\_germoplasma\\_1280.pdf](https://www.bioersityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Gu%C3%ADa_para_el_manejo_eficaz_de_un_banco_de_germoplasma_1280.pdf)
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5.879), 1.034-1.039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Harekrushna, S., & Kumar, D. C. (2012). A review on: Bioremediation. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 2(1), 13-21. [https://www.researchgate.net/publication/281320632\\_A\\_Review\\_on\\_Bioremediation](https://www.researchgate.net/publication/281320632_A_Review_on_Bioremediation)
- Kameswara Rao, N., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma*. Bioersity International. [https://www.bioersityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Manual\\_para\\_el\\_manejo\\_de\\_semillas\\_en\\_bancos\\_de\\_germoplasma\\_1261\\_01.pdf](https://www.bioersityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Manual_para_el_manejo_de_semillas_en_bancos_de_germoplasma_1261_01.pdf)

- Lemos Junior, W. J. F., Binati, R. L., Felis, G. E., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Volatile organic compounds from *Starmerella bacillaris* to control gray mold on apples and modulate cider aroma profile. *Food Microbiology*, 89, artículo 103446. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103446>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5.970-5.975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Ma, J., & Sugawara, H. (2011). Activities of World Federation for Culture Collections (WFCC) World Data Centre for Microorganisms (WDCM). *Microbiology and Culture Collections*, 27(2), 79-81. [https://www.jsmrs.jp/journal/No27\\_2/No27\\_2\\_79.pdf](https://www.jsmrs.jp/journal/No27_2/No27_2_79.pdf)
- Noreña-P, A., González Muñoz, A., Mosquera-Rendón, J., Botero, K., & Cristancho, M. A. (2018). Colombia, an unknown genetic diversity in the era of Big Data. *BMC Genomics*, 19(8), 61-73. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5194-8>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2014). *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. <http://www.fao.org/3/a-i3704s.pdf>
- Ortega Andrade, S., & Guevara Vega, A. (2017, 3-5 de julio). *Darwin Core: estándar para la gestión de datos biológicos primarios en la UTN* [presentación en conferencia]. Primer Encuentro Latinoamericano de Ciencia, San José, Costa Rica. <https://documentas.redclara.net/bitstream/10786/1296/1/Darwin%20Core%20Est%C3%A1ndar%20para%20la%20Gesti%C3%B3n%20de%20Datos%20Biol%C3%B3gicos.pdf>
- Painting, K. A., Perry, M. C., Denning, R. A., & Ayad, W. G. (1995). *Guidebook for genetic resources documentation: A self-teaching approach to the understanding, analysis and development of genetic resources documentation*. International Plant Genetic Resources Institute. [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Guidebook\\_for\\_genetic\\_resources\\_documentation\\_432.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Guidebook_for_genetic_resources_documentation_432.pdf)
- Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W. J. G. M., Liu, W., Lu, T., Hu, B., Chen, J., Chen, J., Lin, Z., & Qian, H. (2020). Rhizosphere microbiome assembly and its impact on plant growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5.024-5.038. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00073>
- Rivera-Gutiérrez, H. F., & Suárez Mayorga, A. M. (2005). *Estándar para la documentación de metadatos de conjuntos de datos relacionados con biodiversidad: versión 2*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Robert, V., Szoke, S., Jabas, B., Vu, D., Chouchen, O., Blom, E., & Cardinali, G. (2011). BioloMICS software: Biological data management, identification, classification and statistics. *The Open Applied Informatics Journal*, 5, 87-98. <https://benthamopen.com/contents/pdf/TOAINFOJ/TOAINFOJ-5-87.pdf>

- Rokem, J. S., Lantz, A. E., & Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*, 24(6), 1.262-1.287. <https://doi.org/10.1039/b617765b>
- Wieczorek, J., Bloom, D., Guralnick, R., Blum, S., Döring, M., Giovanni, R., Robertson, T., & Viegliis, D. (2012). Darwin Core: An evolving community-developed biodiversity data standard. *PLoS ONE*, 7(1), artículo e29715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029715>
- Wu, L., Sun, Q., Sugawara, H., Yang, S., Zhou, Y., McCluskey, K., Vasilenko, A., Suzuki, K.-I., Ohkuma, M., Lee, Y., Robert, V., Ingsriswang, S., Guissart, F., Philippe, D., & Ma, J. (2013). Global catalogue of microorganisms (gcm): A comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics*, 14, artículo 933. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-933>



# Glosario

↑ *Trichoderma* sp., CMIB

**Actividad biológica:** efectos benéficos o adversos de un microorganismo que es, generalmente, un agente biocontrolador sobre organismos *target*.

**Agente biológico:** microorganismo, virus, artrópodo, sustancia o mezcla de sustancias producidas por ellos que, por su capacidad de antagonismo, competencia, antibiosis o patogenicidad, es empleado en el control biológico de plagas.

**Anillo de Dinger:** zona densa de crecimiento característica de cepas de *Leptospira* en medio semisólido EMJH.

**Antagonista:** microorganismo capaz de reducir o inhibir la actividad patogénica de un fitopatógeno.

**Antibiosis:** interacción que involucra un compuesto de bajo peso molecular o un antibiótico producido por un microorganismo que tiene un efecto negativo sobre otro. Es un mecanismo de supresión atribuido particularmente a ciertas especies de bacterias y hongos.

**Bioensayo:** prueba experimental realizada en laboratorio o invernadero que permite verificar la actividad biológica de un bioinsumo de uso agrícola.

**Bioplaguicida microbiano:** producto constituido por una sola cepa o por la mezcla de varios microorganismos compatibles que se usa como herramienta en el manejo integrado de cultivos.

**Caracterización fisiológica y bioquímica:** pruebas que evidencian de forma rápida una determinada actividad enzimática, de un grupo de enzimas o de una vía metabólica, a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que el microorganismo transforma o no al crecer.

**Caracterización morfológica:** primer paso que se realiza a la hora de autenticar cepas, teniendo en cuenta la morfología colonial de la cepa (homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias) y su observación en el microscopio (forma y tamaño celular, movilidad, etc.).

**Cepa:** cultivo puro de un clon de una especie debidamente identificado y caracterizado, al cual se le atribuye una acción biológica definida y que se utiliza para iniciar procesos de multiplicación masiva y como material de referencia en el control de calidad de bioinsumos.

**Colección biológica:** conjunto de organismos o partes de estos organizado con el fin de proporcionar información sobre la procedencia, colecta e identificación de cada uno de sus especímenes.

**Competencia:** comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, ya sea este un nutriente o un nicho específico para su crecimiento.

**Congelación:** proceso que permite conservar al máximo la estructura física y biológica de las accesiones; se comprende como congelación las temperaturas menores a cero grados. En conservación por congelación de microorganismos, la temperatura deseable debe ser menor a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Conservación:** proceso realizado con el objetivo de preservar las accesiones pertenecientes a las colecciones biológicas.

**Control biológico:** uso de organismos vivos para suprimir una plaga o reducir su población o impacto, haciéndola menos abundante o dañina.

**Criopreservación:** preservación de células, tejidos, órganos o embriones por congelamiento. En preparados histológicos, la criopreservación o criofijación se usa para mantener la forma, la estructura y la composición química de todos los elementos constituyentes de las muestras.

**Ensayos de eficacia:** ensayos de validación, en laboratorio o en campo, de la capacidad del microorganismo de causar mortalidad sobre el organismo *target*.

**Entomopatógeno:** microorganismo capaz de causar una enfermedad al insecto plaga, conduciéndolo a su muerte después de un corto periodo de incubación. Generalmente, se han reportado hongos, bacterias y virus entomopatógenos para el control de numerosas plagas.

**Fitopatógeno:** organismo capaz de causar enfermedad en las plantas al afectar su metabolismo celular; generalmente son bacterias, hongos, levaduras, nematodos, virus, etc.

**Germinación:** proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que, al crecer o alargarse, dan origen a las hifas.

**Infestación:** invasión o colonización externa de animales o de sus inmediaciones por artrópodos que pueden provocar signos clínicos o ser vectores potenciales de agentes patógenos.

**Ingrediente activo:** organismo o sustancia a la cual se le atribuye la actividad biológica y la eficacia agronómica en los bioinsumos de uso agrícola.

**Liofilización:** proceso de conservación de las accesiones en el que se congela y se descongela el microorganismo pasando por el vacío y a presión atmosférica baja.

**Micoparasitismo:** ataque directo por el antagonista hacia un fitopatógeno específico, sea necrótofo o biótrofo; esto ocurre concomitantemente con la producción de metabolitos secundarios tóxicos y de enzimas como quitinasas, celulasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas, que degradan la pared celular de diversos fitopatógenos.

**Microscopía de campo oscuro:** técnica de contraste en la que solo la luz difractada desde el espécimen se usa para formar la imagen. El espécimen aparece brillante contra un fondo oscuro. Se utiliza en muestras transparentes sin tinción, como células vivas.

**Medio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris):** es utilizado para el crecimiento, la propagación y el mantenimiento de cepas de *Leptospira*.

**Parasitemia:** presencia detectable de hemoparásitos en la sangre.

**Prueba de viabilidad:** metodología desarrollada para determinar si el material conservado es capaz de crecer en medio de cultivo, si está puro y si concuerda con su identificación antes de su conservación.

**Recuentos microbianos:** cuantificación del número de microorganismos presentes en una muestra.

**Teleogina:** garrapata adulta (hembra) ingurgitada de sangre.

**Vector:** invertebrado o vertebrado no humano que transmite organismos infecciosos de un hospedero a otro.

Esta publicación hace parte de las acciones de promoción y divulgación del Banco de Germoplasma de Microorganismos en su interés de fortalecer capacidades técnicas, científicas y metodológicas en conservación, caracterización y uso de las colecciones a su cargo, además de promover condiciones para la interconectividad e interoperabilidad de estas. El conocimiento plasmado en este libro es producto de una trayectoria de años de investigación por parte de cada uno de los curadores, que han dejado su legado y sus enseñanzas en una acción de relevo generacional que esperamos que sea de gran ayuda tanto para los próximos curadores como para quienes buscan, en su hacer diario, aumentar y conservar la diversidad microbiana. Entregamos este libro como parte de una estrategia de gestión de conocimiento para garantizar y mantener un uso sostenible de la agrobiodiversidad y contribuir de forma eficiente al crecimiento económico del país.

# AGROSAVIA

Corporación colombiana de investigación agropecuaria

Centro de Investigación Tibaitatá.  
Km 14 vía Mosquera-Bogotá, Cundinamarca.  
Código postal 250047, Colombia.

Línea de atención al cliente: 018000121515  
atencionalcliente@agrosavia.co  
<http://www.agrosavia.co/>