

# Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo

## Preservation methods for actinobacterias with phosphate solubilizing activity

*Tatiana Ortiz*<sup>\*</sup>, *Valeria Ocampo*<sup>\*\*</sup>, *Luis Daniel Prada*<sup>\*\*\*</sup>, *Marcela Franco-Correa*<sup>\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47683

### Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes métodos de conservación para actinobacterias solubilizadoras de fósforo debido a la poca información de métodos específicos reportados para estos microorganismos. Los métodos de conservación se evaluaron a 3 diferentes periodos de tiempo; largo, mediano y corto plazo, usando métodos de congelación y liofilización; arcilla, sílica, arena y transferencia periódica, respectivamente. Para ello se usaron 15 aislamientos de 3 localidades diferentes (La Vega, Maní y Tota) y un banco de referencia de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana. Se prepararon todos los inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) y se ajustaron a una concentración de  $10^8$  cel/mL, seguido a ello se inocularon los viales de cada método de conservación con sus respectivos crioprotectantes, glicerol 20% (v/v), 30% (v/v) para congelación y skim milk 18% (p/v) para liofilización. Los métodos a mediano plazo se ejecutaron de igual manera, el inóculo se agregó a 10 perlas de arcilla, 10 g de arena y 5 g de sílica, posteriormente se almacenaron a 4 °C. El método de corto plazo se evaluó en agar avena (15 g/L). La evaluación se realizó mediante recuento directo en cámara de Neubauer por la técnica de azul de tripán, además de la caracterización macroscópica y microscópica de cada aislamiento en transferencia periódica. Se estableció que la actividad solubilizadora de fósforo se mantuvo más estable en los métodos de glicerol 30 % (p/v) y liofilización según el análisis estadístico.

**Palabras clave:** viabilidad, crioprotectantes, banco, liofilización, crioconservación.

### Abstract

The aim of this research was to evaluate different methods of preservation for actinobacteria with phosphate solubilization activity due to there are a few specific methods reported for these organisms. The methods were evaluated at three different time periods; long, medium and short-term and employing methods as cryopreservation and dry-freezing; clay, silica and sand; and periodically plating, respectively. Therefore 15 isolates from 3 different locations (La Vega, Maní and Tota) and a bank reference from Livestock Research Unit of the Pontificia Universidad Javeriana were used. All inocula were prepared in 0.85% saline solution (w/v) which were adjusted to a concentration of  $10^8$  cells/mL, followed each vial was inoculated with their respective storage cryoprotectants, glycerol 20% (v/v), 30% (v/v) to freeze and 18% skim milk (w/v) for dry-freezing. Medium-term methods were performed similarly; the inoculum was added to 10 clay beads, 10 g of sand and 5 g of silica and then stored at 4 °C. The short-term method was evaluated in oatmeal agar (15 g/L). The evaluation was performed by direct counting in a Neubauer chamber using trypan blue staining technique, in addition to macroscopic and microscopic characterization of each isolate in periodic plating. It was established that the phosphorus solubilizing activity was more stable in glycerol 30% (w/v) and lyophilization for statistical analysis.

**Keywords:** viability, cryoprotectants, bank, dry-freezing, cryopreservation.

**Recibido:** noviembre 18 de 2015      **Aprobado:** octubre 26 de 2016

\* Microbióloga Industrial M.Sc. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, tatsortiz.ortiz@gmail.com

\*\* Microbióloga Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, ocampov1946@gmail.com

\*\*\* Microbiólogo Industrial M. Sc. UNIDIA, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, luisd09@hotmail.com

\*\*\*\* Microbióloga PhD. GBAI, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, franco@javeriana.edu.co

## Introducción

Para la elección de un método de conservación se deben tener en cuenta cuatro aspectos fundamentales: mantener el 70% de las células viables, la pureza, la estabilidad genética al final de la conservación de los aislamientos (García & Uruburu, 2001) y los costos que implica el proceso (Parra *et al.*, 2006). Existen diversos métodos de conservación entre los que se encuentran congelación y liofilización; sílica gel, arcilla y arena; y transferencia periódica, clasificándose según el tiempo en largo, mediano y corto plazo respectivamente. Es necesario entonces, encontrar métodos que permitan la conservación de microorganismos que presentan características de gran interés, como producción de metabolitos secundarios o en este caso la solubilización de fósforo.

El fósforo es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, sin embargo no se encuentra frecuentemente en formas disponibles en el suelo, por lo cual las plantas no pueden usarlo para su desarrollo. Existen diversas formas de transformar fósforo no disponible, en formas disponibles como la solubilización mediante la producción de ácidos orgánicos la cual libera fósforo inorgánico como ortofosfatos, que pueden ser asimilados por las plantas para su crecimiento. Existen diferentes microorganismos capaces de solubilizar fósforo como las actinobacterias, bacterias Gram positivas filamentosas, ampliamente distribuidas en distintos tipos de ambientes como el suelo y agua, aunque también se pueden encontrar en el hombre; son microorganismos heterótrofos, aerobios y su temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 30°C (Franco, 2008), sin embargo, se han reportado pocos métodos de conservación para actinobacterias, por lo tanto el objetivo de este trabajo es definir un método adecuado de conservación para actinobacterias que presenten actividad solubilizadora de fósforo.

## Metodología

Se seleccionaron 15 aislamientos (Prieto *et al.*, 2015) de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana para el estudio, las cuales presentaron actividad solubilizadora de fósforo según Prada, Prieto & Franco (2014).

### Métodos de largo plazo (1 año de conservación)

#### Liofilización

Se usó un liofilizador LABCONCO FREEZE DRY SISTEM / FREE ZONE 4.5 el cual se mantuvo una temperatura de -50°C, se usaron viales con una capacidad volumétrica de 2,5 mL y como crioprotector Skim Milk al 18% (p/v), se prepararon inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) a una concentración de  $10^8$  cel/mL (García & Uruburu, 2001). Para ello se realizaron recuentos en cámara de Neubauer, efectuando una tinción de

viabilidad con azul de tripán al 0,05% para evidenciar las células vivas de células muertas (Cardona *et al.*, 2005). Finalmente, el inóculo con el crioprotector se ajustó en una proporción 1:1 y se almacenaron a una temperatura de 4°C (García & Uruburu, 2001). Para su reactivación se tomaron 0,5 mL de solución salina con una jeringa de 3 mL y se agregaron al liófilo homogenizando la solución, posteriormente se realizó el recuento en cámara de Neubauer para determinar la viabilidad y una tinción de Gram para confirmar la pureza.

#### Congelación

Para llevar a cabo el proceso se utilizaron crioviales de 1,5 mL, para ello se prepararon dos soluciones de glicerol en agua destilada: glicerol al 20% (p/v) y glicerol al 30% (p/v), seguido a ello se prepararon los inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) realizando recuento en cámara de Neubauer, por último el inóculo más el crioprotector se ajustó en una proporción 1:1, luego de esto se guardaron los crioviales de glicerol al 20% (p/v) a una temperatura de -20°C y los de glicerol al 30% (p/v) a una temperatura de -80°C (Perry, 1998). Para su reactivación se tomó un criovial de cada una de las concentraciones y se realizó el recuento directo en cámara como se mencionó anteriormente.

### Métodos de mediano plazo (6 meses de conservación)

#### Arena estéril

Es un sustrato el cual se ha estudiado para conservación de hongos específicamente patógenos (Nakasone *et al.*, 2004), sin embargo, en este estudio se probó con actinobacterias, para ello se tomaron 10 g de arena que se depositaron en viales con capacidad de 50 mL y se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos. Por otra parte se realizó un recuento en cámara ajustando el inóculo como se reportó anteriormente. Se tomó 1 mL del inóculo y se agregó a 10 g de arena estéril para almacenarlos a una temperatura de 4°C (García & Uruburu, 2001). Para su reactivación se tomó 1 g de la muestra y se agregó a 9 mL de solución salina, se realizó un recuento directo en cámara.

#### Sílica gel

Se tomaron 5 g de Sílica y se introdujeron en viales con capacidad de 50 mL, se esterilizaron a 180°C durante 90 min, finalmente se dejaron enfriar y se colocaron en una bandeja con hielo durante 24 horas (Perkins, 1962) (Nakasone *et al.*, 2004); posteriormente se realizó el recuento en cámara de Neubauer para ajustar la concentración del inóculo. Se agregaron 0,7 mL del inóculo a 5 g de Sílica y se almacenaron a 4°C (García & Uruburu, 2001). Para la reactivación se tomó 1 g de Sílica y se realizó un recuento directo en cámara.

## Arcilla

Se tomaron 3 g de Sílica y se colocaron en un vial de 50 mL, seguido a ello se colocó algodón sobre la Sílica. En otro vial se colocaron 10 perlas de arcilla y se mandaron a esterilizar con calor seco a 180°C durante 2 horas. Por otra parte se realizó el recuento en cámara de Neubauer para ajustar la concentración del inóculo, posteriormente se colocaron las perlas de arcilla en el inóculo durante 5 minutos en condiciones de esterilidad, luego se colocaron las perlas de arcilla previamente inoculadas en el vial que contiene la Sílica, se sellaron y se almacenaron a 4°C (García & Uruburu, 2001). Para su reactivación se tomaron todas las perlas de cada vial y se realizó un recuento directo en cámara.

## Método de corto plazo

### Transferencia periódica

Es el método más simple y más utilizado para la conservación a corto plazo de bacterias, consiste en la transferencia periódica del cultivo en un medio líquido o sólido y su incubación a temperatura adecuada hasta la obtención del crecimiento (Freire & Sato, 1999), para ello se sembraron en agar avena (Correa, 2008) los aislamientos de actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo incubándolas a 25 °C, a los 8 días se realizó caracterización macroscópica y microscópica de cada uno. Este procedimiento se repitió mensualmente durante 4 meses.

### Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo

Se tomó un Erlenmeyer de 100 mL al cual se le adicionaron 18 mL de medio NBRIP con fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) en una concentración de 5g/L como fuente de fosforo insoluble y 2 mL de inóculo ajustado a una concentración de ( $10^8$  cel/mL), seguido a ello se incubaron a 23°C y 120 rpm durante 5 días. Luego del tiempo de incubación, cada una de las muestras se llevó a centrifugar por 15 minutos a 5000 rpm, posteriormente se tomó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo de los aislamientos que presentan mayor solubilización según lo establecido por Prada, Prieto & Franco (2014) las cuales son *Streptomyces* MCR24, *Streptomyces* T3A y *Streptomyces* T3C; este proceso se realizó por triplicado; la cuantificación se realizó con el test SPECTROQUANT de Merck® (Murphy & Riley, 1962) efectuando lo propuesto por el protocolo 365.2 de la EPA Phosphorous, All forms (colorimetric, ascorbic acid and single reagent, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 880 nm). Para el desarrollo de esta prueba se preparó una curva patrón cuya solución estándar fue 0.01 mg de P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )/mL.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante una prueba de varianza simple (ANOVA) y una prueba de Tukey para

comparación de medias con un  $\alpha$  de 0,05. Se realizaron tres réplicas por ensayo. Como herramienta informática se utilizó el programa SPS 11,0 para software de Windows®.

### Análisis de costos

La estimación de los costos de la investigación se realizó mediante la sumatoria de todos los insumos y materiales usados por cada tratamiento evaluado, a su vez se incluyó el costo de un operario. Cada uno de los valores presentados en la tabla 4 implica un banco de conservación equivalente a 100 unidades por cada método.

## Resultados

Se seleccionaron los mejores aislamientos con actividad solubilizadora de fósforo de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana, según los resultados obtenidos por Franco (2008) y Prada, Prieto & Franco (2014); dichos aislamientos se sometieron a siete diferentes tratamientos de conservación divididos en largo, mediano y corto plazo.

Para evaluar la viabilidad de cada uno de los aislamientos en los diferentes métodos de conservación se llevó a cabo un recuento directo en cámara de Neubauer (Cardona *et al.*, 2005) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un  $\alpha$  del 0,05, posteriormente se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar el mejor método a largo y mediano plazo de cada uno de los aislamientos como se observa en las tablas 1 y 2. La comparación de medias se realizó entre cada uno de los aislamientos.

En cuanto al método de corto plazo, transferencia periódica, se realizaron caracterizaciones morfológicas en las cuales se evidenció que ninguno de los aislamientos presentaron cambio alguno durante el transcurso del tiempo, sin embargo la actividad solubilizadora de fósforo fue baja obteniendo resultados de 9,05 a 20,84 ppm para los aislamientos seleccionados en comparación con los valores obtenidos por Prada, Prieto & Franco (2014).

Para evaluar la actividad solubilizadora de fósforo se tomaron 3 aislamientos de actinobacterias que presentaron la mayor actividad solubilizadora (396 y 526 ppm) en estudios previamente realizados (*Streptomyces* MCR24, *Streptomyces* T3A y *Streptomyces* T3C) (Prada *et al.*, 2014). Mediante un análisis de varianza ANOVA de un factor, con un  $\alpha$  de 0,05 y posteriormente una prueba de Tukey se determinó el mejor método de conservación relacionado con la preservación de la actividad para cada uno de los aislamientos. En la tabla 3, se observan los diferentes tratamientos evaluados y la concentración de fósforo soluble en ppm de cada aislamiento. Los resultados demostraron que para *Streptomyces* MCR24 existen diferencias es-

**Tabla 1.** Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a largo plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación\*

Aislamientos	Promedios de Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Liofilización (cel/mL)	% Viabilidad	Promedios de Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Glicerol 20% (cel/mL)	% Viabilidad	Promedios de Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Glicerol 30% (cel/mL)	% Viabilidad
<i>Streptomyces</i> MCR1	9,000	7,799a	87	9,000	<b>7,633a</b>	85	9,000	8,204b	91
<i>Streptomyces</i> MCR9	8,602	8,114b	94	9,000	<b>8,477c</b>	94	8,602	7,146a	83
<i>Streptomyces</i> MCR24	8,477	<b>8,000a</b>	94	8,845	<b>8,114a</b>	92	8,477	7,845a	93
<i>Streptomyces</i> MCR26	8,301	7,954a	96	8,778	<b>7,968a</b>	91	8,301	8,964b	108
<i>Kitasatospora</i> L3A	8,903	7,982b	90	9,000	<b>8,301c</b>	92	8,903	6,863a	77
<i>Streptomyces</i> L4B	8,301	<b>7,968b</b>	96	8,954	<b>8,000b</b>	89	8,301	6,820a	82
<i>Streptomyces</i> L4C	9,000	8,000a	89	8,699	<b>7,982a</b>	92	9,000	8,477b	94
<i>Streptacidiphilus</i> M2A	9,000	7,602b	84	8,000	<b>7,724b</b>	97	9,000	6,833a	76
<i>Streptomyces</i> T1B	9,000	7,968a	89	9,000	<b>8,000a</b>	89	9,000	7,881a	88
<i>Streptomyces</i> T1C	9,000	8,000a	89	9,000	<b>8,000a</b>	89	9,000	7,863a	87
<i>Streptomyces</i> T1J	8,301	<b>8,301c</b>	100	8,000	<b>7,863b</b>	98	8,301	6,763a	81
<i>Streptomyces</i> T3A	9,301	<b>8,204b</b>	88	9,000	<b>8,000ab</b>	89	9,301	7,813a	84
<i>Streptomyces</i> T3B	9,000	<b>8,204b</b>	91	9,000	<b>7,903a</b>	88	9,000	8,176b	91
<i>Streptomyces</i> T3C	9,000	<b>8,000a</b>	89	9,000	<b>7,968a</b>	89	9,000	7,892a	88
<i>Streptomyces</i> T3D	8,301	<b>8,000b</b>	89	8,778	<b>7,982b</b>	91	8,301	7,820a	94

\* Comparación entre aislamientos para el mismo tratamiento, los métodos de conservación más efectivos para cada aislamiento se presentan en negrilla. Según la agrupación de medias de Tukey, cada letra (a, b ó c) correspondiente a los grupos formados por la prueba de comparación de medias con un  $\alpha$  de 0,05

estadísticamente significativas en cuanto a los métodos de conservación evaluados siendo glicerol 30% (p/v) el mejor tratamiento, *Streptomyces* T3A no presenta diferencias significativas ya que los datos presentaron un comportamiento similar, sin embargo, se eligió la media más alta la cual corresponde al tratamiento de liofilización. *Streptomyces* T3C muestra que hay diferencias significativas entre los métodos, dónde liofilización y glicerol (30%) fueron los métodos que tuvieron mejor efecto en el mantenimiento de la actividad fisiológica de interés que fue la solubilización de fósforo (tabla 3).

En la tabla 4 se observan algunos valores resaltados en negrilla, los cuales indican en la viabilidad y actividad solubilizadora de fósforo los valores más altos; y en costos, los valores más bajos o más económicos por cada tratamiento.

## Discusion de resultados

Debido a la gran variedad que presentan los microorganismos no se ha reportado un método óptimo de conservación para éstos en general, incluso para un grupo particular de microorganismos como las actinobacterias, estas bacterias son conocidas por su impor-

tancia biotecnológica y biológica en diversos campos, hecho relacionado con su alta diversidad metabólica y presencia en diversidad de nichos ecológicos (Franco & Chavarro, 2016). Aun así, son limitadas las investigaciones relacionadas con la forma de almacenamiento de los miembros de este grupo, por lo cual de manera común se hace uso de los métodos de conservación de otros grupos bacterianos para preservarlos. En muchas ocasiones esto puede funcionar, pero no es idóneo generalizar ni someter estos microorganismos a las mismas condiciones de conservación que los otros filum, debido a que este grupo presenta características fenotípicas, fisiológicas y genéticas propias que hacen posible determinar un adecuado método de conservación. Además, la conservación de las actinobacterias tiene como objetivo mantener sus características originales por las cuales fueron seleccionadas, lo que no siempre es posible pues se han reportado frecuentemente re-arreglos génicos así como otros mecanismos genéticos (transferencia horizontal de genes) que pueden modificar las características deseables durante sus periodos de almacenamiento, hecho que se aprecia en algunas ocasiones fenotípicas y especialmente por cambios de caracteres morfológicos (Leblond et al., 1990), (Birch et al., 1990), (Ventura et al., 2007).

**Tabla 2.** Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a mediano plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación\*

Aislamientos	Promedios de Rcto. Inicial (cel/ mL)	Promedios de Rcto Arcilla (cel/ mL)	% Viabilidad	Promedios de Rcto. Inicial (cel/ mL)	Promedios de Rcto Arena (cel/ mL)	% Viabilidad	Promedios de Rcto. Inicial (cel/ mL)	Promedios de Rcto Sílica (cel/ mL)	% Viabilidad
<i>Streptomyces</i> MCR1	8,477	7,903ab	93	8,000	8,000b	100	8,000	<b>7,778a</b>	97
<i>Streptomyces</i> MCR9	8,301	7,699a	93	8,000	<b>8,000b</b>	100	8,000	7,699a	96
<i>Streptomyces</i> MCR24	8,000	<b>8,000a</b>	100	7,477	<b>7,954a</b>	106	7,477	7,845a	105
<i>Streptomyces</i> MCR26	8,602	7,903a	92	8,602	8,000a	93	8,602	<b>7,903a</b>	92
<i>Kitasatospora</i> L3A	8,301	7,845a	95	8,477	<b>7,954a</b>	94	8,477	7,845a	93
<i>Streptomyces</i> L4B	7,477	<b>8,000b</b>	107	7,477	<b>7,954ab</b>	106	7,477	4,602a	62
<i>Streptomyces</i> L4C	8,301	7,699a	93	7,301	7,778a	107	7,301	<b>7,602a</b>	104
<i>Streptacidiphilus</i> M2A	8,477	8,000b	94	8,602	<b>8,000b</b>	93	8,602	7,602a	88
<i>Streptomyces</i> T1B	7,903	8,477b	107	8,301	<b>8,699c</b>	105	8,301	7,778a	94
<i>Streptomyces</i> T1C	8,602	7,845a	91	7,301	<b>8,699b</b>	119	7,301	7,903a	108
<i>Streptomyces</i> T1J	8,477	<b>7,477a</b>	88	7,301	7,903a	108	7,301	7,778a	107
<i>Streptomyces</i> T3A	8,000	<b>8,000b</b>	100	8,602	8,301c	97	8,602	7,778a	90
<i>Streptomyces</i> T3B	8,301	<b>7,845a</b>	95	7,301	8,301b	114	7,301	7,954a	109
<i>Streptomyces</i> T3C	8,000	<b>7,845a</b>	98	8,602	8,301b	97	8,602	7,845a	91
<i>Streptomyces</i> T3D	7,477	<b>7,602a</b>	102	7,301	7,903b	108	7,301	7,699ab	105

\* Comparación entre aislamientos para el mismo tratamiento, los métodos de conservación más efectivos para cada aislamiento se presentan en negrilla. Según la agrupación de medias de Tukey, cada letra (a, b ó c) correspondiente a los grupos formados por la prueba de comparación de medias con un  $\alpha$  de 0,05

En el presente estudio no se apreció ningún cambio morfológico, macroscópico o microscópico, en los microorganismos evaluados durante los periodos de almacenamiento, lo cual sugiere que los métodos usados brindan estabilidad génica. Sin embargo, a pesar de no encontrar rasgos morfológicos que sugieran alteraciones genéticas, el uso de la transferencia periódica ha demostrado pérdida en la actividad solubi-

lizadora de los microorganismos al ser comparados con otros métodos y sus reportes previos (Prada *et al.*, 2014) lo que invalida la transferencia como método de conservación. Este hecho resalta la importancia de la estandarización y uso de métodos a mediano y largo plazo para la adecuada conservación de estas actinobacterias de importancia biotecnológica.

**Tabla 3.** Evaluación de la solubilización de fósforo a partir de los tratamientos\*.

Tratamiento	Concentración de P soluble (ppm)		
	MCR24	T3A	T3C
Liofilización	22,54 ± 1,826 a	<b>51,36 ± 0,024 a</b>	<b>13,51 ± 0,414 c</b>
Glicerol 20%	20,04 ± 2,056 a	45,26 ± 2,251 a	0,44 ± 0,270 a
Glicerol 30%	<b>43,18 ± 4,742 b</b>	39,02 ± 4,129 a	<b>15,05 ± 0,8 c</b>
Arcilla	26,65 ± 4,612 ab	45,26 ± 2,857 a	6,87 ± 1,438 b
Arena	27,86 ± 5,492 ab	44,63 ± 5,628 a	6,34 ± 1,218 b
Sílica	30,52 ± 2,120 ab	47,29 ± 0,698 a	2,47 ± 0,571 a

\* Los métodos de conservación más efectivos para cada aislamiento se presentan en negrilla. Según la agrupación de medias de Tukey, cada letra (a, b ó c) correspondiente a los grupos formados por la prueba de comparación de medias con un  $\alpha$  de 0,05. Promedio de la concentración ± Error estándar.

**Tabla 4.** Viabilidad, concentración de fósforo soluble y costos de los tratamientos evaluados\*.

Plazos	Tratamiento	Viabilidad	Actividad solubilizadora de P (ppm)	USD/Método
Largo	Liofilización	7,954	29.13	19.970,499
	Glicerol 20%	<b>8,000</b>	21.91	<b>13.114,340</b>
	Glicerol 30%	7,903	<b>32.42</b>	15.459,506
Mediano	Arena	<b>8,000</b>	26.28	10.791,428
	Arcilla	7,903	26.26	<b>9.938,450</b>
	Sílica gel	7,699	<b>26.76</b>	10.823,213
Corto	T. Periódica	Cualitativo	23.23	10.767,253

\* Los cuadros en negrilla representan los tratamientos seleccionados en cuanto a la mejor viabilidad, concentración más alta de fósforo soluble y los costos más bajos.

Uno de los estudios más relevantes para actinobacterias en cuanto al estudio de métodos de almacenamiento a largo plazo se realizó por Filippova, Surgucheva & Gal'chenko (2012) en el que se reportaron niveles críticos en la viabilidad tras realizar la evaluación de sus bancos liofilizados con aceite mineral y cultivos de suelo. La pérdida de la viabilidad para las cepas evaluadas fue cercana al 35%. De igual manera fue difícil reactivar algunos liófilos y a su vez se observaron cambios en las características morfológicas, como la pérdida de color en el micelio y producción de micelio aéreo. En el presente estudio con el método de liofilización no se evidenció la pérdida de ninguna cepa y los porcentajes de viabilidad del recuento inicial frente al recuento posterior a la conservación, fueron mayores al 87%, lo cual puede deberse al crioprotectante usado en este caso Skim Milk que genera una mayor ventaja al usado en el estudio de Filippova et al. (2012), además cabe resaltar que la baja viabilidad puede estar ligada a periodos mucho más largos de almacenamiento, mayores a 1 año, lo que en el estudio de Filippova et al. (2012), pudo afectar procesos celulares generando desecación y procesos de oxidación celular.

En la tabla 1, se observa que los microorganismos de este estudio no presentan afinidad por un método en específico. En las evaluaciones a largo plazo, por ejemplo, el 46% de los aislamientos presentaron mayor afinidad con glicerol al 20% (p/v) aunque la diferencia porcentual en cuanto a liofilización no es significativa, ya que el 33% de los aislamientos se ajustaron mejor a éste método el cual ha sido ampliamente reportado (Burguet et al., 2012) (Chen et al., 2006). Esto se debe al fuerte impacto que reciben las células por el proceso de sublimación que disminuye notablemente el porcentaje de viabilidad de los microorganismos por causas de estrés sobre la célula, (Bozoglú et al., 1987) (Prakash et al., 2013). Así mismo, este proceso se puede ver afectado por la concentración del crioprotectante,

algunos autores como García & Uruburu (2001) reportan el uso de Skim Milk al 18% (p/v) como la concentración óptima para la protección del microorganismo, sin embargo ésta puede ser un factor limitante de la viabilidad debido al proceso de ultracongelación, al cual son sometidos antes de ser liofilizados. Por otra parte la crioprotectante ha sido reportada como un buen método de conservación (Hubalek, 2003) tanto para bacterias como para hongos, sin embargo es un método que afecta tanto la viabilidad como la actividad dependiendo de la temperatura y concentración del crioprotectante utilizado, el glicerol es un compuesto que en altas concentraciones, mayores a 30%, se puede volver tóxico para las células puesto que penetra la membrana celular. Como se observa en la tabla 1, tres aislamientos de los quince evaluados presentan buenos resultados con este método, por lo tanto es adecuado como método de conservación. Al ser la actividad solubilizadora de fósforo uno de los factores que se debe mantener durante el periodo de la conservación en la tabla 3 se puede observar que el glicerol 30% (p/v) es el método que presenta mayor mantenimiento de la actividad fisiológica de los microorganismos, dando como resultado una mayor concentración de fósforo soluble al transcurrir un año de conservación para los 3 aislamientos, esto quizás se debe a que la congelación rápida influye en la preservación de la actividad la cual está proporcionalmente ligada a la viabilidad.

Los métodos a mediano plazo se seleccionaron debido a que han sido reportados para microorganismos que se encuentran generalmente en el suelo, las matrices presentes en este medio forman asociaciones físicas con las Actinobacterias, tales como arenas o arcillas pueden contribuir a los buenos resultados en cuanto a viabilidad. El 86% de los aislamientos presenta mayor afinidad en arena como matriz de conservación como se observa en la tabla 2. La arena tiene un tamaño de 0,10 a 0,25 mm (Hodgson, 1987) lo cual limita el

paso de agua, aire, entre otros factores que pueden beneficiar el crecimiento (Glyan & Gary, 1999) de las Actinobacterias, por lo tanto permite la conservación de dichos microorganismos sin influir en su cinética de crecimiento. Por otra parte ningún aislamiento presentó afinidad por el método de sílica gel aunque ha sido reportado como método de conservación y en repetidas ocasiones presenta buenos resultados fenotípicos y de estabilidad genética como en estudios realizados con *Escherichia coli* HB101 por Sidiyakina y Golimbet (1991) o el trabajo de Álvarez, Pieckenstain, Desimone, Estrella, Ruíz & Díaz (2010), los cuales mencionan una eficiente protección y preservación de *Mesorhizobium* spp. de importancia agroindustrial por tener la capacidad de fijar nitrógeno. Aun cuando es reportado que los microorganismos Gram positivos tienden a sobrevivir más los procesos de preservación en sílica gel que microorganismos Gram negativos (Trollope, 1975), esto no se vio reflejado en este estudio, como se observa en la tabla 2, esto se da porque es un material sintético fabricado a partir de silicato sódico, un compuesto desecante que elimina por completo la humedad y puede afectar la viabilidad celular y al mismo tiempo la actividad. Por otro lado la arcilla al ser un compuesto natural como la arena, permite la conservación de la viabilidad como se observa en la tabla 2, aunque solo dos aislamientos presentaron alta afinidad por este método ya que es un compuesto el cual ha cambiado sus propiedades físicas originales al ser sometido a un proceso térmico, lo que aumenta su porosidad y por lo tanto permite la conservación del microorganismo en dicha matriz.

El análisis de costos determinó que el método de glicerol al 20% correspondiente a largo plazo y arcilla de mediano plazo, fueron los métodos más económicos de cada uno de los tiempos evaluados, aunque no presentaron los mejores resultados de viabilidad y actividad solubilizadora, la concentración de fósforo soluble no disminuyó más del 32%, lo que permite inferir que los métodos evaluados son eficaces y su elección se debe realizar según el interés que se tenga al momento de llevar a cabo la conservación.

## Conclusión

Aun cuando los métodos de liofilización fueron muy efectivos en este estudio y son a su vez recomendados por "The American Type Culture Collection" o autores como Yocheva et al., 2002, los resultados de este estudio concluyen que los métodos de conservación más eficientes en general para la conservación de actinobacterias solubilizadoras de fósforo fueron los de crioconservación con glicerol al 30%, el uso de este método de crioconservación es rápido, de bajo costo y apropiado para largos periodos de conservación, lo cual coincide con lo reportado por Rifaat (2009). Por otro lado el método con arena arrojó los mejores resultados en cuanto a viabilidad, mantenimiento de la actividad y costo siendo ideal para usar en el mo-

mento de estar trabajando de manera activa con algún aislamiento en particular. Sin embargo se logró evidenciar que no todos los microorganismos se conservan manteniendo las respectivas cualidades evaluadas de la misma manera, por lo cual se sugiere de ser posible, conservar cada microorganismo con el método que preserve dichas cualidades de interés de la forma más efectiva.

## Referencias bibliográficas

- Álvarez, G. S., Pieckenstain, F. L., Desimone, M. F., Estrella, M. J., Ruiz, O. A., & Díaz, L. E. (2010). Evaluation of Sol-Gel Silica Matrices as Inoculant Carriers for Mesorhizobium Spp. Cells. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, ed. A. Mendez-Vilas, Formatex.
- Birch, A., Häusler, A., & Hütter, R. (1990). Genome Rearrangement and Genetic Instability in *Streptomyces* spp. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4138-4142
- Bozoğlu, T., Özilgen, M., & Bakir, U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(9), 531-537.
- Burget, N., Sierra, N., & Brito, L. C. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 1-4.
- Cardona, G. I., Arcos, A., & Murcia, U. (2005). Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 317-326.
- Chen, H., Lin, C., & Chen, M. (2006). The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(1), 126.
- Filippova, S. N., Surgucheva, N. A. & Gal'chenko, V. F. (2012). Long-Term storage of collection cultures of Actinobacteria. *Microbiology*, 81(5), 630-637.
- Franco, M., & Chavarro V. (2016). Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/actinobacteria-as-plant-growth-promoting-rhizobacteria>.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*, Editorial de la Universidad de Granada.
- Freire, J., & Sato, M. (1999). Conservación de cultivos de rizobios. *Revista Latinoamericana De Microbiología-México*, 41(1), 35-42.
- García, M., & Uruburu, F. (2001). La conservación de cepas microbianas Colección microbiana de cultivos tipo (CECT) Universidad de Valencia, España. Temas de la actualidad. Recuperado de [http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30\\_12.pdf](http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf)
- Glyan, H. & Gary, H. (1999). Ingeniería ambiental. 2ª edición. In Prentice Hall (Ed.), pp. 271-273
- Grivell, A., & Jackson, J. (1969). Microbial culture preservation with silica gel. *Microbiology*, 58(3), 423-425.
- Hodgson, J. (1987). *Muestreo y descripción de suelos*. Barcelona, España: Reverté.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.

- Huertas, S. L. P., Casas, M. M. P., Morales, M. B., Moreno, Z. S., & Castaño, D. M. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*, 4(5), 39-49.
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J.M., & Decaris, B. (1990). Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Molecular Microbiology*, 4(5), 707-714. Doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00641.x
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures.
- Parra, S. L., Pérez, M. M., Bernal, M., Suárez, Z., & Montoya, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova - Publicación científica*, 4(5), 39-49.
- Perkins, D. D. (1962). Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(4), 591-594.
- Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9(1), 59-64.
- Prada, L. D., Prieto, G. C., & Franco, M. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the eastern cordillera of the Colombian andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett*, 339(1), 1-9.
- Prieto, G. C., Prada, L. D., Cuervo, C., & Franco, M. (2015). Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 111-121.
- Rifaat, H. M. (2009). Viability study of some locally isolated *Streptomyces*. *Journal of Culture Collections*, 6(1), 38-41.
- Sidyakina, T. M., & Golimbet, V. E. (1991). Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with the recombinant plasmid during preservation by various methods. *Cryobiology*, 28(3), 251-254.
- Trollope, D. R. (1975). The preservation of bacteria and fungi on anhydrous silica gel: an assessment of survival over four years. *Journal of Applied Bacteriology*, 38(2), 115-120.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495-548.
- Yocheva, L., Najdenova, M., Doncheva, D., & Antonova-Nikolova, S. (2002). Influence of the long-term preservation on some biological features of three *streptomyces* strains, producers of antibiotic substances. *Journal of Culture Collections*, 3, 25-32.