

COLECCIÓN DE CEPAS MICROBIANAS USADAS EN FORMACIÓN Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN APLICADA EN EL CENTRO PARA LA FORMACIÓN CAFETERA SENA REGIONAL CALDAS

COLLECTION OF MICROBIAL STRAINS USED IN TRAINING AND APPLIED RESEARCH PROJECTS AT THE CENTER FOR COFFEE EDUCATION - SENA REGIONAL CALDAS

Laura Patricia Bermeo Escobar ¹

Diana Marcela Flórez Ríos ²

Manuela Ocampo Gómez ³

Marisol Franco ⁴

Recibido:16-08-2016 Aceptado:22-11-2016

Resumen

Las colecciones de cultivos microbianos son consideradas centros de recursos biológicos ya que permiten conservar cepas de microorganismos que pueden ser utilizadas en diferentes estudios microbiológicos, biotecnológicos, educativos e investigativos; por eso es necesario aplicar métodos de preservación adecuados que aseguren su viabilidad, disponibilidad y resguardo de sus características fenotípicas, genotípicas y el potencial industrial. El objetivo del presente trabajo fue establecer una colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada del Centro para la Formación Cafetera - SENA Regional Caldas. En este estudio se conservaron doce cepas microbianas provenientes de trabajos de investigación realizados por instructores y aprendices empleando las técnicas de preservación en agua destilada estéril y glicerol al 10 %. Dicha conservación se realizó en tubos crioviales de 2 mL ajustados a una densidad óptica 1 (9×10^8 UFC/mL) de la escala de McFarland. La viabilidad y pureza de las cepas conservadas se evaluó, reactivándolas en medios de cultivo selectivos para cada tipo de microorganismo, con el fin de observar cambios en las características fisiológicas y morfológicas de los cultivos y determinar la eficiencia de los métodos de conservación evaluados. De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se pudieron identificar plenamente 12 géneros microbianos correspondientes a

1. Colombiana, Ingeniera de Alimentos; Maestrante en Microbiología Agroindustrial.

Instructora Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Manizales. lpbermeo4@misena.edu.co. Tel 3127704401.

2. Colombiana, Tecnóloga en Control Ambiental, Especialización Tecnológica en Calidad de Aguas, Ingeniera Ambiental.

Laboratorista Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Manizales. diamar.florez@misena.edu.co. Tel 3117225088.

3. Colombiana. Tecnóloga en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Industria.

Manizales. mocampo81@misena.edu.co Tel 3225095504

4. Colombiana. Tecnóloga en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Industria.

Manizales. mfranco1@misena.edu.co Tel 3116191551

Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Salmonella sp, Clostridium perfringens, Lactobacillus

plantarum, *Lactobacillus* sp, *Pseudomona putida*, *Pseudomona mendocina* y *Hafnia alvei*, así mismo se observó un crecimiento positivo de estos microorganismos conservando su viabilidad y pureza en las dos técnicas de preservación utilizadas.

Palabras Clave: biotecnología, cepas, conservación, cultivos microbianos, microorganismos.

Abstract

The Collections of microbial cultures are considered centers of biological resources because they preserve strains of microorganisms that can be used in different microbiological, biotechnological, educational and research studies; therefore is necessary to apply appropriate preservation methods to ensure their viability, availability and protection of their phenotypic

characteristics, genotypic and industrial potential. The aim of this study was to establish a collection of microbial strains for use in training and applied in research projects at Coffee for training Center SENA-Regional Caldas.

In this study instructors conducted twelve microbial strains from research and trainees using preservation techniques in sterile distilled water and 10 % glycerol those were retained. Preservative was performed in 2 mL cryovials tubes adjusted to an optical density 1 (9×10^8 UFC/mL) MacFarland scale. The viability and purity was assessed preserved strains, resuming them in selective media for each type of microorganism, in order to observe changes in physiological and morphological characteristics of the cultures and to determine the efficiency of preservation methods evaluated. According to the results obtained in tests, they could be identified fully 12 microbial genera corresponding to *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella* sp, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* sp, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina* and *Hafnia alvei*, likewise positive growth of these microorganisms retain their viability was observed in both purity and preservation techniques used.

Keywords: biotechnology, strains, conservation, microbial cultures, microorganisms.

1. Introducción.

Los microorganismos representan un papel fundamental para el sostenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales; además del potencial que tienen como fuente de recursos biológicos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura, la biotecnología, entre otras, (Burguet, Sierra, & Brito, 2012; Morales et al., 2010)

De acuerdo a lo anterior las colecciones microbianas constituyen una herramienta de importancia para el progreso y desarrollo de diferentes ramas de la ciencia y de ahí la necesidad de mantener y disponer de cultivos microbianos de calidad mediante el uso de diversos métodos de preservación que garanticen que el cultivo a conservar sea puro, reduciendo al mínimo la posibilidad de contaminación, que aseguren al menos la supervivencia del 70% de las células por un periodo determinado de tiempo; además que estas células permanezcan genéticamente estables (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008; Burguet et al., 2012; García & Uruburu, 2000; Fernández et al., 2013; Godínez & Calderón, 2008; Fernández et al., 2012; Henao, Franco, & Marín, 2006).

Con el fin de dar respuesta a estas necesidades se han desarrollado a través de los años diferentes métodos para el mantenimiento y conservación de organismos como bacterias y hongos, entre los que se encuentran la liofilización, congelación, transferencia periódica, suspensión en agua destilada estéril, en capa de aceite mineral, desecación en papel de filtro, desecación en suelo, arena, silicagel, entre otros; con los que se busca detener el crecimiento de las células microbianas sin causar pérdida de viabilidad. Además de mantener la estabilidad y pureza de los organismos preservados (Gato, 2010; García & Uruburu, 2000; Ryan & Smith, 2004; Sarmiento, Hazel, & Cárdenas, 2013). Por otro lado la elección de un método u otro depende del tipo de microorganismo a preservar, del tiempo que se deseen mantener conservados los cultivos, de los recursos del laboratorio, así como el entrenamiento del personal encargado (Rico et al., 2004; Weng, Olvido, & Álvarez, 2005).

En Colombia, instituciones como la Universidad Javeriana de Bogotá y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, son las únicas

que tienen colecciones microbianas registradas ante la WDCM (World Data Centre for Microorganisms) ocupando el octavo lugar de los nueve países participantes de América con estas colecciones, y que representa solo el 1,27 % del total aportado por los países del continente Americano (González & Jiménez, 2014); sin embargo este es un avance para el país y un reto para aumentar este tipo de colecciones a nivel internacional. Por otro lado, existen otras entidades como La Universidad Francisco de Paula Santander, La Universidad Católica de Manizales, El Instituto Colombiano de Medicina Tropical, El Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI), El Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFÉ), entre otras, que han ido construyendo dentro de sus instalaciones colecciones microbianas más pequeñas, para su uso en diferentes estudios e investigaciones. No obstante el acceso a ese tipo de material biológico por parte de personal externo a estas entidades es un poco limitado y complejo.

Ante esta situación, se hizo necesario conservar adecuadamente el material biológico proveniente de diversos proyectos en el Centro para la Formación Cafetera, en aras de mejorar la calidad y pertinencia de los procesos de formación e investigación aplicada; de satisfacer las necesidades de instructores, aprendices y empresas del sector productivo; de tener acceso a material biológico para diversos procesos y de estar al día en las tendencias del mercado sobre el uso de microorganismos.

Disponer de forma permanente de este tipo de recursos es indispensable para orientar algunos programas de formación y desarrollar nuevos proyectos de investigación en el centro de formación, aportando de esta manera al avance científico de la institución ya que en el momento no se cuenta con este tipo de colecciones que permitan dar respuesta a los requerimientos mencionados anteriormente.

Por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue establecer una colección de cepas microbianas para su uso en formación y proyectos de investigación aplicada del Centro para la Formación Cafetera del SENA Regional Caldas, a través de la conservación de cepas utilizando diferentes métodos para garantizar la viabilidad, pureza, características fenotípicas y genotípicas de dichos organismos.

2. Materiales y Métodos

La metodología usada para el establecimiento de un cepario, consta de varias actividades que van desde el aislamiento, caracterización, identificación hasta la conservación de los microorganismos, y deben ser desarrolladas continuamente sobre los organismos que se van incluyendo en la colección.

Para desarrollar el presente estudio fue necesario implementar métodos de conservación que garantizaran la pureza y viabilidad de los microorganismos, por tanto se eligieron los métodos de preservación en agua destilada estéril y glicerol al 10 %, ya que han sido validados y recomendados para el mantenimiento de microorganismos por ser sencillos, económicos, seguros y capaces de garantizar la supervivencia de los cultivos por períodos prolongados; de igual manera se escogieron estas técnicas porque se ajustan a los recursos físicos, económicos y humanos disponibles en el centro.

Como variables de respuesta seleccionadas para evidenciar la efectividad de estos métodos y evaluar si los organismos conservaban sus características fenotípicas, genotípicas y el potencial industrial, se utilizaron las pruebas de viabilidad y pureza.

De acuerdo a lo anterior, la metodología descrita a continuación corresponde únicamente a la ejecutada para conservar los 12 microorganismos que conforman actualmente la colección microbiana.

Ubicación del sitio del ensayo

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Ciencias Básicas del SENA Regional Caldas, ubicado en la ciudadela tecnológica Los Cerezos, Km 10 vía al Magdalena.

Recolección de información

La información proveniente de los análisis realizados durante el desarrollo del proyecto fue recolectada por medio de observación directa, evidencias fotográficas y listas de chequeo.

Material biológico

En este estudio se emplearon cepas microbianas provenientes de diferentes trabajos de investigación realizados por instructores y aprendices del Centro para la Formación Cafetera del SENA Regional Caldas.

Siembra de los microorganismos

Se realizó la siembra de los microorganismos por la técnica de agotamiento con el fin de observar la pureza de las cepas. Las levaduras fueron sembradas en agar PDA y las bacterias en agar nutritivo. Posteriormente, fueron incubados durante 48 horas, a una temperatura de 25° C para levaduras y 37° C para bacterias.

Caracterización macroscópica de las cepas

Se realizó la caracterización macroscópica de las colonias mediante la observación directa teniendo en cuenta aspectos como: forma, margen o borde, elevación, textura o consistencia, color.

Caracterización microscópica de las cepas

Se realizó la caracterización microscópica de las colonias a través de la tinción de Gram para observar forma, agrupación y composición de la pared celular de los microorganismos.

Caracterización bioquímica de los microorganismos

Se realizó la caracterización de los microorganismos por medio de pruebas bioquímicas utilizando los medios de cultivo TSI, LIA, KIA, RM-VP, SIM, Urea y Citrato de Simmons, también se utilizaron pruebas bioquímicas rápidas API 20 E, BBL Crystal Entéricos, API 50 CH, API 20 A, API 50 CHB y API Candida. Las siembras se incubaron a 37° C por un periodo de 24-48 horas.

Conservación de los microorganismos en agua destilada estéril

Se realizó la siembra de los microorganismos mediante la técnica de siembra masiva con el fin de obtener una gran cantidad de biomasa; las levaduras

y bacterias fueron sembradas en agar PDA y agar nutritivo respectivamente, estos microorganismos fueron incubados durante 24-48 horas, a una temperatura de 25° C para levaduras y 37° C para bacterias.

Para obtener la suspensión madre, se tomaron 50 mL de agua destilada estéril y la biomasa obtenida en las cajas de petri, ajustando la concentración hasta una densidad óptica 3 (9×10^8 UFC/mL) de la escala de Macfarland. A partir de dicha suspensión se hizo una dilución en agua destilada estéril hasta llegar a una densidad óptica 1 (3×10^8 UFC/mL) de la escala de Macfarland.

Posteriormente esta solución se transfirió a tubos crioviales estériles de 2 mL, los cuales se rotularon y se llevaron a conservación en refrigeración a 4° C.

Conservación de los microorganismos en glicerol al 10 %

Se realizó la siembra de los microorganismos por la técnica de siembra masiva con el fin de obtener una gran cantidad de biomasa; las levaduras y bacterias fueron sembradas en agar PDA y agar nutritivo respectivamente, estos microorganismos fueron incubados durante 24-48 horas, a una temperatura de 25° C para levaduras y 37° C para bacterias.

Utilizando las siembras realizadas anteriormente, se preparó una suspensión madre con 50 mL de agua destilada estéril y la biomasa obtenida en las cajas de petri, ajustando la concentración hasta una densidad óptica 3 (9×10^8 UFC/mL) de la escala de Macfarland. A partir de dicha suspensión se hizo una dilución en glicerol estéril al 10% hasta llegar a una densidad óptica 1 (1×10^8 UFC/mL) de la escala de Macfarland.

Posteriormente esta solución se transfirió a tubos crioviales estériles de 2 mL, los cuales se rotularon y se llevaron a congelación gradual de la siguiente manera: 1 hora a 4 °C, 1 hora a -4 °C y por último se almacenaron a -20° C.

Pruebas de viabilidad y pureza

Las pruebas de viabilidad y pureza se realizaron a los tiempos: inicial y seis meses, para ello los microorganismos preservados se recuperaron de

la siguiente forma: los crioconservados (glicerol al 10 %) fueron sometidos a descongelación rápida, en baño maría a 37° C por 5 minutos y para el caso de los microorganismos preservados en agua destilada estéril se emplearon directamente. Luego se sembró cada uno de los microorganismos en cajas de petri con agar PDA para levaduras y agar nutritivo para bacterias, aplicando el método de siembra en superficie.

Posteriormente se llevaron a incubar a una temperatura de 25° C para levaduras y 37° C para bacterias; el tiempo de incubación fue mayor al convencional debido a que los microorganismos preservados tienen un crecimiento más lento por las condiciones de almacenamiento. Finalmente los microorganismos reactivados fueron evaluados, teniendo en cuenta la viabilidad como el crecimiento de los mismos en las cajas de petri y la pureza como la ausencia de otro tipo de microorganismos.

3. Resultados y discusión

Caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica.

Los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de los microorganismos en estudio, se observan en las Tablas 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Tabla 1. Caracterización macroscópica de los microorganismos.

Microorganismo	Color	Textura	Elevación	Forma	Borde
<i>Bacillus subtilis</i>	Crema	Mucoide	Convexa	Circular	Regular
<i>Bacillus pumilus</i>	Crema	Mucoide	Elevada	Irregular	Irregular
<i>Candida albicans</i>	Blanca	Blanda	Aplanada	Irregular	Regular
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Crema	Cremosa	Aplanada	Irregular	Irregular
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Crema	Cremosa	Convexa	Circular	Regular
<i>Salmonella sp</i>	Crema	Cremosa	Convexa	Circular	Irregular
<i>Clostridium perfringens</i>	Crema	Áspera	Convexa	Irregular	Irregular
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Crema	Cremosa	Convexa	Circular	Regular
<i>Lactobacillus sp</i>	Crema	Cremosa	Convexa	Circular	Regular
<i>Pseudomona putida</i>	Crema	Membranosa	Plana	Circular	Regular
<i>Pseudomona mendocina</i>	Crema	Blanda	Elevada	Circular	Regular
<i>Hafnia alvei</i>	Crema	Blanda	Convexa	Circular	regular

Tabla 2. Caracterización microscópica de los microorganismos.

Microorganismo	Forma	Agrupación	Tinción de Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilos	Cadenas	Gram +
<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilos	No forma	Gram +
<i>Candida albicans</i>	Ovoide	Racimos	Gram +
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacilos cortos	Cadenas	Gram -
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ovoide	Racimos	Gram +
<i>Salmonella sp</i>	Bacilos	No forma	Gram -
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacilos	Cadenas	Gram -
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos	Cadenas	Gram +
<i>Lactobacillus sp</i>	Bacilos	Cadenas	Gram +
<i>Pseudomona putida</i>	Bacilos cortos	Cadenas	Gram -
<i>Pseudomona mendocina</i>	Bacilos cortos	No forma	Gram -
<i>Hafnia alvei</i>	Bacilos cortos	Cadenas	Gram -

Tabla 3. Caracterización bioquímica de los microorganismos.

Pruebas	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
bioquímicas					
SIM	+	+	-	+	+
Movilidad					
SIM	-	-	-	+	+
Indol					
SIM	+	-	+	-	-
H₂S					
Rojo Metilo	+	-			
V.P	-	-		+	+
Citrato	+	+		+	+
Simmons					
Urea	-	-		-	-
LIA	K/K	K/K			
KIA	+	K/K	A/A	A/A	A/A
TSI	K/A	K/K		A/A	

Tabla 4. Pruebas bioquímicas rápidas de los microorganismos.

Pruebas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
bioquímicas rápidas												
SIM	-	-	-	*	*	*	*	+	+	-	+	+
Movilidad												
SIM	-	-	-	*	*	*	*	-	-	-	+	+
Indol												
SIM	-	-	-	*	*	*	*	+	-	+	-	-
H ₂ S												
Oxidasa	+	+	-	*	*	*	*	-	+	-	-	-
BBL Crystal	*	*	+	*	*	*	*	+	+	*	*	*
Entéricos												
API 20 E	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
API 50 CH	*	*	*	+	+	*	*	*	*	*	*	*
API	*	*	*	*	*	+	+	*	*	*	*	*
Candida												
API 20 A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+	*	*
API 50 CHB	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+	+

De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos en estudio (Tablas 1 y 2) éstas características concuerdan con la descripción establecida en el Manual de Bergey; por lo tanto se puede decir que los microorganismos caracterizados corresponden a los géneros identificados (Brenner, Krieg, & Staley, 2005).

Las tablas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de los microorganismos en estudio; a través de esta se pudo determinar la presencia o ausencia de diferentes enzimas presentes en el material genético de sus cromosomas; estas enzimas involucradas en su metabolismo, fueron evidenciadas en los medios de cultivo utilizados que tienen los sustratos sobre los cuales estos actúan, junto con un sistema indicador que manifiesta la degradación del sustrato o la presencia de metabolitos específicos. Lo anterior permitió identificar con un porcentaje de confiabilidad alto el tipo de organismo a nivel de género y especie (García & Mendoza, 2014).

Viabilidad y pureza

El proceso de reactivación de los microorganismos conservados, dio como resultado que todas las cepas preservadas (doce) lograron crecer satisfactoriamente sobre los medios de cultivo utilizados para cada tipo de organismo, mostrando un crecimiento propio que concuerda con la caracterización macroscópica inicial, además no se presentaron problemas de contaminación, lo que indica que los métodos de conservación en agua destilada estéril y glicerol al 10 % son apropiados para el mantenimiento de este tipo de organismos (Arencibia, et al., 2008). Sin embargo, el método de agua destilada estéril mostro una mayor eficiencia en la recuperación de las cepas comparado con el método de glicerol al 10 %, debido a que los procesos de congelación afectan la viabilidad de las células conservadas. Por otro lado la conservación en agua destilada estéril no maneja temperaturas de congelación que aunque no detiene totalmente el crecimiento de los microorganismos permite que estos permanezcan activos metabólicamente y puedan recuperarse más fácilmente sobre un medio de cultivo sólido, estos resultados concuerdan con los obtenidos por (Martínez, León, & González, 2009).

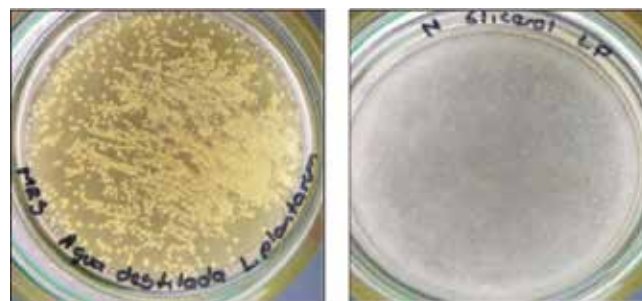


Figura 1. Colonias de *Lactobacillus plantarum* (después de 6 meses de conservación en agua destilada y glicerol al 10%)

4. Conclusiones

El presente proyecto contribuyó al establecimiento de una colección de cultivos microbianos en el Centro para la Formación Cafetera, compuesto inicialmente por 12 cepas debidamente caracterizadas, identificadas y conservadas de manera adecuada, lo que ha permitido tener un acceso constante por parte de instructores y aprendices a dichos cultivos, para la

ejecución de procesos de formación y desarrollo de proyectos de investigación.

A través de la caracterización macroscópica y microscópica de las colonias, fue posible tener un primer acercamiento a la identificación de los microorganismos en estudio.

Los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de los organismos estudiados, permitió llegar a la identificación de éstos a nivel de género y especie con buenos porcentajes de confiabilidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se evidenció que el método de conservación en agua destilada estéril presentó mayores índices de recuperación de los microorganismos preservados, respecto al método de conservación en glicerol al 10 % después de los periodos de recuperación evaluados.

Las pruebas de viabilidad y pureza mostraron resultados favorables en los diferentes tiempos evaluados evidenciado crecimiento abundante y puro de las colonias.

Los métodos de preservación utilizados en este estudio, presentaron resultados satisfactorios en cuanto a viabilidad y pureza de las cepas conservadas, por lo tanto pueden ser aplicados a laboratorios con recursos limitados teniendo en cuenta las características de cada técnica, la factibilidad de su uso y las necesidades del usuario.

Se recomienda incluir en la colección microorganismos provenientes de otros proyectos de investigación, con el fin de conservar las características que los hacen importantes a nivel industrial y enriquecer el tamaño del cepario.

5. Referencias

1. Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. La Habana, Cuba: Finlay.
2. Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (eds. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2, Parts B. New York: Editorial Board. <http://doi.org/10.1245/s10434-010-1229-3>
3. Burguet, N., Sierra, N., & Brito, L. (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.
4. Fernández, C., Díaz, L., Illnait, M., Aragonés, C., Martínez, G., & Perurena, M. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(1), 49–54.
5. Fernández, C., Díaz, L., Illnait, M., Aragonés, C., Martínez, G., Perurena, M., & Rodríguez, I. (2013). Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(3), 361–369.
6. García, M., & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30, 12–16.
7. García, P., & Mendoza, A. (2014). Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(2), 249–254.
8. Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
9. Godínez, S., & Calderón, M. (2008). Métodos alternativos para la preservación de hongos filamentosos. *Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 18(2), 31–37.
10. González, D. M., & Jiménez, J. N. (2014). Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*, 4(1), 23–33.

11. Henao, I., Franco, M., & Marín, G. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum, Revista de La Facultad de Ciencias*, 11(2), 51– 60.
12. Martínez, A., León, M., & González, G. (2009). Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, XLIII(2), 47–50. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=223120662007>
13. Morales, Y., Duque, E., Rodríguez, O., De la Torre, J., Martínez, R., Pérez, R., & Muñoz, J. (2010). Bacterias Preservadas , una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnología*, 14(2), 11–29.
14. Rico, M., Piattoni, C., Gonzalez, C., Monela, R., Latorre, M., & Lurá, M. (2004). Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista FABICIB*, 8, 163– 172.
15. Ryan, M. J., & Smith, D. (2004). Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycological Research*, 108(12), 1351–1362. <http://doi.org/10.1017/S0953756204001650>
16. Sarmiento, Y., Hazel, A., & Cárdenas, D. (2013). Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp . y *Azotobacter* sp . conservados por diferentes métodos *Revista Colombiana de Biotecnología*, XV(1), 150–158.
17. Weng, Z., Olvido, E., & Álvarez, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 43(3), 1–4.