UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ACTUALIZACIÓN Y MEJORAMIENTO DE CEPARIO DE LABORATORIO DE FISIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE FRUTOS

PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: BÁRBARA ROJAS NÚÑEZ

PROFESOR GUÍA: CARLOS FIGUEROA LAMAS

TALCA – CHILE

2018

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.

Talca, 2019

ÍNDICE

1. Resumen 4

2. Introducción 5

3. Revisión bibliográfica 7

3.1 Conservación por congelación 10

3.1.1 Congelación ordinaria 12

3.1.2 Congelación Ultrafría 12

3.1.3 Congelación con nitrógeno líquido 13

3.2 Cultivos de referencia 14

3.3 *Escherichia coli* 15

3.4 *Agrobacterium tumefaciens* 16

3.5 Intercambio génico de células procariotas 17

3.6 Plásmidos 19

3.7 Estándares de calidad nacional e internacionales 20

4. Hipótesis 22

5. Objetivos 23

5.1 Objetivo general 23

5.2 Objetivos específicos 23

6. Materiales y métodos 24

6.1 Cepas disponibles 24

6.1.2 Cepas de almacenamiento permanente 24

6.2 Antibióticos 27

6.3 Preparación antibióticos 28

6.4 Medios de cultivo 29

6.4.1 Medio de cultivo líquido 29

6.4.2 Medio de cultivo sólido con antibióticos 29

6.5 Glicerol 30

6.6 Primera Resiembra 30

6.7 Confirmación de propiedades genéticas de la cepa 31

6.8 Confirmación de cepas 32

6.9 Almacenamiento de cepas 32

6.10 Análisis de métodos de conservación 33

6.11 Elaboración de protocolo de resiembra y documentos de almacenamiento 33

7. Resultados 34

7.1 Primera resiembra 34

7.2 Análisis características genotípicas de las cepas 36

7.3 Análisis métodos de almacenamiento 38

7.4 Elaboración protocolos de resiembra 40

7.5 Elaboración códigos de almacenamiento 40

7.5.1 Código de cepas 40

7.5.2 Código cajas criogénicas 41

7.6 Elaboración documentos de registro de cepas 41

8. Discusión 42

9. Conclusión 48

10. Referencias bibliográficas 50

11. Anexos 53

11.1 Anexo 1. “Protocolo de resiembra” 53

11.2 Anexo 2. “Documento almacenamiento de cepas 56

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por brindarme su apoyo incondicional durante estos años.

A Ing. Biotecnología vegetal Paz Zúñiga por la paciencia y amabilidad y al proyecto CONICYT, FONDECYT/Regular 1181310 por el financiamiento, muchas gracias.

1. RESUMEN

La implementación de un cepario en un laboratorio de investigación no suele ser fácil debido a que no existe un conceso a nivel nacional o mundial respecto a cómo éste debería ser organizado, requerimientos de almacenamiento o documentos de trabajo, sólo existiendo guías de diferentes laboratorios, y recomendaciones de entidades administradores de calidad como la ISO, cada una con sus propias metodologías y control de calidad.

Al analizar los protocolos provenientes de diferentes laboratorios, así como también las recomendaciones de instituciones oficiales, se realizó un protocolo para este laboratorio en particular ateniéndose a los requerimientos del mismo.

El Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Frutos (FBMF) de la Universidad de Talca cuenta con una amplia variedad de cepas bacterianas de trabajo con inserción de plásmidos realizadas en el lugar, sin embargo, este laboratorio no cuenta con un protocolo de trabajo ni de almacenamiento óptimo.

La técnica de almacenamiento más utilizada es la congelación, en donde mediante el uso de criotubos, caldo Luria y criopreservantes tales como glicerol y leche descremada bacteriológica, se logra el correcto almacenamiento de las cepas.

Los nuevos registros de las cepas, así como también protocolos de trabajo y registros permiten el trabajo óptimo del laboratorio en relación a las cepas almacenadas, permitiendo que exista una trazabilidad en el trabajo.

2. INTRODUCCIÓN

Los cepario son el nombre que se le otorga a las colecciones de microorganismos, en este caso de bacterias, los cuales contienen cepas que presentan alguna propiedad física o química que le confiere un valor para el trabajo en el laboratorio, ya sea clínico o de investigación.

En el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Frutos (FBMF) de la Universidad de Talca existe un cepario bacteriológico con cepas de trabajo propias, las cuales presentan características físico químicas especiales para realizar trabajos de investigación a nivel de todo el personal perteneciente al FBMF, incluyendo vectores de resistencia frente a diferentes antibióticos, así como también "vectores libres" para la adición de genes de interés. Por lo que la pureza y correcta manipulación de las cepas es crucial para lograr un trabajo óptimo y con resultados veraces en el laboratorio.

La problemática comienza al momento de no presentar un sistema de almacenamiento óptimo con los registros adecuados del trabajo previo con las cepas, su fecha de almacenaje, resiembras para corroboración de viabilidad de las mismas y nombre de la persona encargada de dicho proceso en forma de documentos fácilmente accesibles para todos los usuarios del FBMF. Sin embargo, este tipo de dificultades puede que no sean tan infrecuentes en un laboratorio de investigación y docencia, puesto que no existe un consenso nacional o internacional concerniente a los protocolos de implementación y trabajo dentro de los cepario.

Dentro de la literatura se encuentran numerosas guías de trabajo cada una realizada e implementada por cada laboratorio de manera particular, entre las técnicas descritas, el consenso es que una técnica con buenos resultados y costo/efectiva es el método de

congelación. Junto con ello los registros dependen de la naturaleza de la cepa, pudiendo ser una cepa de referencia comercial, una cepa de trabajo o cepas creadas en el mismo laboratorio para su uso.

El método de congelación incluye la adición de criopreservantes para su mantenimiento como el glicerol, y leche descremada bacteriológica, así como el caldo nutritivo en el cual se homogenizan las bacterias, pudiendo ser caldo soya tripticasa, caldo infusión cerebro corazón o caldo Luria. Las proporciones de criopreservantes dependerán de la temperatura de congelación a la cual serán sometidas las cepas, lo que a su vez depende de los recursos disponibles en cada laboratorio.

La aplicación de un protocolo de trabajo para almacenar las cepas en conjunto con la documentación y registros adecuados permitirá que el trabajo en el laboratorio sea más eficiente y eficaz además de trazable para todo el personal que haga uso de las cepas almacenadas por el laboratorio.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los microorganismos representan una gran parte de la biodiversidad genética esencial para la vida la tierra, ya que provee casi ilimitados recursos para el desarrollo de nuevas aplicaciones para el área de biotecnología. (1) Cuando se habla de cepa en microbiología, se habla de un microorganismo de una única especie y que es descendiente de una única célula, en donde se mantienen las características genéticas de la misma. (2)

Los ceparios o también conocidos como colecciones de microorganismos, son fuentes de recursos genéticos teniendo como función preservar la diversidad biológica. Existen diversas entidades que se dedican al cultivo, almacenamiento y comercialización de cepas bacterianas, entre los que destacan *American Type Culture Collection* (ATCC) en USA, *Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares* (CDBB) en México, *National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria* (NCIMB) en Reino Unido y *National Collection of Cultures of Microorganisms* (CNCM) del Instituto Pasteur en Francia, entre otras. (3)

En Chile también existen entidades que se dedican a la preservación de microorganismos, así como también a proporcionar las cepas e información con fines investigativos, educativos o producción industrial, como lo son la *Colección Chilena de Cultivos Tipo* (CCCT) perteneciente a la Universidad de la Frontera, la *Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos* (CChRGM) resultado de las investigaciones realizadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en la década del 1990. Es esta última colección la que posicionó a Chile como el primer y único país de Latinoamérica responsable de almacenar microorganismos patentados.(4-6)

El origen de los microorganismos que son parte de los ceparios no siempre corresponde a aquellas cepas creadas en los laboratorios. La mayoría de las cepas almacenadas son aquellas que han sido aisladas de pacientes internados en recintos hospitalarios, en donde la

bacteria que afecta al paciente presenta alguna característica genotípica significativamente diferente a las del resto de las cepas de la misma especie. Generalmente, las cepas de interés clínico son aquellas que presentan resistencia a uno o más antimicrobianos, en donde la naturaleza de aquella resistencia es poco conocida o incluso nueva. (7)

Otro tipo de cepas que pueden encontrarse almacenadas en un cepario, son las llamadas cepas de referencia, que, distribuidas de manera comercial por distintas entidades, aseguran que las cepas son de extrema pureza, pudiendo tener características genotípicas únicas. Su uso principalmente está enfocado a la validación de técnicas de laboratorio, en las que al presentar características específicas, son capaces de ser el control positivo o negativo frente a técnicas de identificación que se usarán en cepas tanto de origen clínico, como de validación de técnicas que se usan en laboratorios de investigación. Estas entidades generalmente son de carácter universal, como lo son las cepas ATCC, utilizadas mundialmente. (8-10)

También existen las cepas creadas en laboratorios de investigación o docencia. Este tipo de cepas tienen generalmente como función ser el vector de pequeñas cadenas de ADN de interés para ser insertadas en otro microorganismo para que sea asimilada una característica que antes no poseía. (7)

Hoy, la importancia de los ceparios radica principalmente en el desarrollo de nuevos procesos industriales, como cepas de referencia para ensayos de laboratorio, también pueden ser usadas como cepas para estudios taxonómicos y como centros de conservación de la biodiversidad. (3)

El mantenimiento de los microorganismos no sólo consiste en la conservación de ellos y de las características que presentan, sino que también la pureza de la cepa, es decir, libre de contaminantes durante largos periodos de tiempo. Es por esto que a través de los años se

han desarrollado diferentes métodos de conservación, lo que se basan principalmente en la disminución de actividad metabólica de los microorganismos. La selección de los métodos de conservación va a depender de los requerimientos de cada microorganismo en particular, además de los requerimientos del laboratorio en donde se va a implementar el cepario. (9, 11, 12)

Dentro de las características a considerar para escoger un método de conservación, se debe tener en cuenta la susceptibilidad del microorganismo a ciertas técnicas, en donde existen ciertos microorganismos que no son capaces de sobrevivir a la liofilización. También se debe considerar la predisposición de los microorganismos para presentar variabilidad genética incluso en estados metabólicos disminuidos. (8, 9, 12)

También se deben tomar otros factores en cuenta, como lo es la cantidad de muestras a conservar y cuál es el método de conservación que se utilizará. Hay que evaluar los costos de los métodos, así como el tiempo de conservación que se pretende emplear y los equipos que se utilizarán para el almacenamiento de todas las cepas, siempre teniendo en cuenta que uno de los requerimientos más importantes a la hora del almacenamiento es conservar la viabilidad de la cepa posterior a su almacenamiento y que no exista contaminación en dicha muestra. (4)

Existen métodos de conservación a largo plazo, los cuales aseguran la estabilidad genética de los microorganismos ya que evitan la replicación. Estos son los métodos de conservación más utilizados para microorganismos que han sido manipulados genéticamente para otorgarle alguna característica en particular y poder ser estudiada o transmitida a otros microorganismos. Dentro de estos métodos se encuentra la congelación y la liofilización. (5)

3.1 CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

También llamado criopreservación, es uno de los métodos de conservación ampliamente utilizados, siendo altamente estable por largos periodos de conservación, pudiendo llegar incluso a los 20 años.

Este proceso se define como la congelación de una cepa a temperaturas inferiores a 0°C, dando lugar a diferentes tipos de congelación: congelación ordinaria, congelación ultra fría y congelación por nitrógeno líquido. Este proceso se realiza para preservar células y tejidos vivos manteniendo su estructura. Una de las cosas más importantes durante este proceso es controlar la velocidad de disminución de temperatura, ya que la conversión de agua a cristales hielo puede causar daño en la estructura celular. Esto se produce debido a que las células están compuestas por aproximadamente 80% de agua, la que al congelarse resulta en la concentración de los solutos en la fase líquida remanente y la consecuente cristalización de todos aquellos solutos que superan el límite de solubilidad. Es por esto que es necesaria la adición de un elemento crioprotector. (8, 12-14)

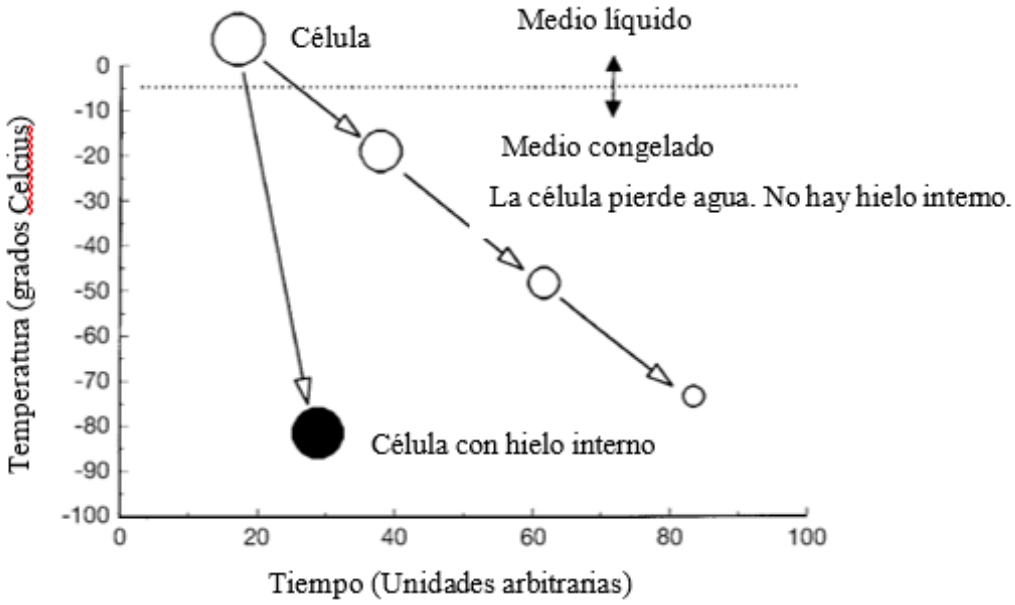

Figura 1. Representación esquemática de células disminuyendo su temperatura rápidamente y congelándose internamente o disminuir la velocidad del proceso para evitar hielo intracelular.(10)

Cuando este tipo de conservación está implementado, se debe tener en cuenta que es necesario evaluar la viabilidad de las cepas con regularidad para asegurar la calidad de ellas llegado el momento de su utilización. Además, es importante considerar que para comenzar a realizar estas técnicas se debe tener en cuenta la edad de las células, es decir, en algunos casos se recomienda la utilización de las bacterias en el inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Sin embargo, algunos microorganismos presentan formas de resistencia. En esos casos se recomienda inducir ese estado, esporulación u otros, antes de comenzar. (15-18)

Los agentes crioprotectores son agentes hidrosolubles, de baja toxicidad y con punto de congelación menor a 0°C, que tienen como función disminuir el punto eutéctico de una solución, es decir, retardar la formación intracelular de cristales de hielo, lo que se traduce en una obtención de concentración dada de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula estará más deshidratada y se reducirá el potencial de daño osmótico durante el congelamiento y descongelamiento de la muestra. Entre los agentes crioprotectores se encuentran alcoholes, carbohidratos, aminoácidos, extractos de levadura y leche descremada. Lo más utilizados en el proceso de congelación son glicerol y dimetil-sulfóxido (DMSO). (14)

El glicerol es un alcohol que al igual que muchas otras moléculas pequeñas sin carga puede atravesar la membrana citoplasmática mediante difusión pasiva, y se ha descrito en la literatura como el único ejemplo de transporte de difusión facilitada por la membrana interna de *Escherichia coli* mediante la proteína integral de membrana GlpF.(12) su mecanismo de acción en cuanto a su función crioprotectora radica en el aumento de la concentración total de solutos, reduciendo la cantidad de cristales de hielo que son formados dentro de la célula. (13)

El DMSO es un solvente bipolar, aprótico, hidrosoluble y de bajo peso molecular. El mecanismo de acción de este crioprotector se atribuye principalmente a la habilidad de

prevenir la acumulación de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento de una célula o tejido, evitando así la formación de cristales de hielo y el daño a las membranas que conlleva. Al tener un bajo peso molecular, este puede atravesar la membrana celular sin problemas. (14)

3.1.1 CONGELACIÓN ORDINARIA

Durante este tipo de congelación se mantienen temperaturas entre -5°C y -20°C, en donde los microorganismos pueden ser almacenados por uno a dos años permaneciendo viables, es decir, cuando los microorganismos sean descongelados estos conservarán todas sus funciones y cualidades. (8, 12, 19)

Este tipo de congelación es uno de los más simples en relación a los equipos que se utilizan, puesto que los congeladores convencionales pueden alcanzar estas temperaturas.

3.1.2 CONGELACIÓN ULTRAFRÍA

Para este tipo de congelación se pueden tomar los microorganismos directamente desde una suspensión bacteriana posterior a una centrifugación, o se puede preparar una suspensión a partir de un cultivo que haya tenido las condiciones óptimas de crecimiento. El cultivo se suspende en un caldo nutritivo junto al criopreservante. Para esta congelación se necesitan congeladores especiales que alcancen temperaturas entre -50°C y -80°C. (8, 12, 20)

Se debe considerar que en este tipo de congelación el control de la disminución de temperatura es de vital importancia para que los microorganismos mantengan su viabilidad. Se recomienda la congelación a una velocidad de 1-2°C por minuto hasta alcanzar los -

30°C. posterior a esto se acelera el proceso hasta alcanzar la temperatura adecuada. Se ha observado que con esta técnica las cepas pueden mantenerse congeladas y viables por cinco años aproximadamente a una temperatura de -60°C en promedio. (15, 17, 19, 21)

3.1.3 CONGELACIÓN CON NITRÓGENO LÍQUIDO

Este tipo de congelación es uno de los más efectivos, logrando temperaturas de conservación entre -150°C y -196°C. El proceso para este tipo de congelación comienza de igual manera que la congelación ultrafría, en donde se controla la disminución de la temperatura hasta los -30°C. Posterior a alcanzar esta temperatura se procede a acelerar la disminución a 1°C por minuto hasta alcanzar los -56°C, una vez logrado esto se procede a suspender los viales en nitrógeno líquido para acelerar el proceso hasta al temperatura adecuada. (8, 12, 15)

Si el microorganismo logra alcanzar esta temperatura de congelación puede permanecer muchos años, entre cinco y treinta cinco, en almacenamiento, ya que el metabolismo celular se detiene por completo cuando se alcanza una temperatura de -130°C. (12, 20)

Una de las ventajas de este proceso es que, si el microorganismo soporta las bajas temperaturas, no es necesario recurrir a las resiembras para evaluar su viabilidad, reduciendo las probabilidades de contaminación, cambios genéticos y bioquímicos del microorganismo.

Por otra parte, una de las desventajas de este tipo de congelamiento es la necesidad de equipos especiales que alcancen este tipo de temperaturas, además de un suministro de nitrógeno líquido lo que eleva bastante el costo de este proceso. (8, 20)

3.2 CULTIVOS DE REFERENCIA

Los cultivos de referencia hacen alusión a cepas de referencia, cepas de reserva y cepas de trabajo dentro de un laboratorio.(22)

Para que las cepas puedan ser consideradas de referencia deben cumplir ciertos requisitos. En primera instancia estas cepas deben ser viables, es decir, deben tener la capacidad de crecer según protocolos adecuados para su recuperación. Segundo, estas cepas deben ser puras, esto quiere decir que al momento de ser sembradas se debe reconocer sólo una cepa mediante cualquier método utilizado. Por último, las cepas deben ser estables, lo que significa que mantienen sus características genotípicas y fenotípicas a través del tiempo.(22, 23)

La conservación y manipulación de estas cepas debe ser regulado mediante protocolos establecidos para así poder asegurar las características que le otorgan el carácter de cepas de referencia y al mismo tiempo prevenir el deterioro de las cepas, la contaminación cruzada y cualquier mutación o alteración de las características genotípicas o fenotípicas.(22-24)

Otra características importante de las cepas de referencia es que son trazables, lo que implica que su origen debe ser directamente de colecciones nacionales o internacionales reconocidas como tales, ya que en estas instituciones es en donde los microorganismos están definidos como género y especie, caracterizados en todos los ámbitos posibles y con un origen conocido.(5, 24)

Es importante considerar que el origen de las cepas de referencia es en primera instancia a partir de aislados de pacientes en donde las bacterias han sido extensamente caracterizadas, así como también modificadas para su uso comercial. (25)

3.3 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae.* Debido a su fácil cultivo y capacidad de multiplicación ha sido usada ampliamente en estudios de biología molecular.(26)

El primer aislado de *E. coli* que fue almacenado fue en 1920 por el Instituto Lester, enviando la cepa a *National Collection of Type Cultures* (NCTC) en Inglaterra, una de las organizaciones con la colección más antigua de microorganismos.(25, 27)

Por otra parte, en 1922 en la Universidad de Standford, fue aislada una cepa a partir de heces de un paciente con difteria y fue catalogada como K12. Este aislado fue usado más tarde, en el año 1940 para estudiar el metabolismo del nitrógeno, y posterior a esto fue almacenada en ATCC. Esta misma cepa fue usada posteriormente para experimentos de síntesis de triptófano. Con el paso del tiempo y diversos experimentos sus características genotípicas fueron cambiando, dando paso a nuevas cepas. Como lo es la cepa MG1655, la cual deriva de la cepa K12 perdiendo el plásmido F y el fago λ. (28)

E. coli DH5α es una de las cepas más populares y ampliamente usadas en los laboratorios. Fue desarrollada por Douglas Hanahan y es una de las *Escherichia coli* K12 más usadas. Tiene características que la hacen conveniente para aplicaciones en clonación. (28, 29)

Puede ser transformada con alta eficiencia; contiene plásmidos de ADN de alta calidad debido a la ausencia de endonucleasas I no específicas (*End*A1); mantiene plásmidos estables debido a los bajos niveles de recombinación homóloga; también puede ser transformada con eficiencia mediante ADN no metilado por la disrupción de la endonucleasa *Eko*KI y es deficiente en la enzima fosfatasa alcalina en el espacio periplásmico, lo que le entrega utilidad al momento de estudiar expresión de proteínas de membrana.(26)

Otra cepa es *E. coli* 2T1R, la cual es una cepa comercial químicamente competente, mejorada para todas las aplicaciones de clonación, ya que no presentan sistemas de restricción como la cepa K12, incluyendo además el genotipo *tonA* que le confiere resistencia a la infección de fago T1 y T5.(30, 31)

3.4 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria Gram negativo perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*. Es un fitopatógeno, es decir patógeno para las plantas, teniendo un carácter parasitario para ellas. Actualmente denominada *Rhizobium radiobacter*, es causante de tumores o "agallas" en plantas, los que crecen en la zona donde se encuentra la raíz y el tallo conectados.(32)

La sintomatología que causa esta bacteria en las plantas se produce por la inserción de un pequeño segmento de ADN de transferencia (T-ADN) a partir de un plásmido hacia las células vegetales, el cual es incorporado por el genoma vegetal.(33)

La capacidad de *A. tumefaciens* para la trasmisión de ADN ha sido ampliamente explorada y utilizada en el campo de la biotecnología, convirtiéndose en el método más usado para la introducción de genes en células vegetales. Jeff Schell y Marc Van Motangu fueron los primeros en describir el mecanismo de transferencia de genes entre *A.*

tumefaciens y plantas, lo que llevó al desarrollo de metodologías para la modificación de la bacteria para aplicaciones en biología vegetal.(34)

La transmisión de genes se hace a partir del plásmido T-ADN, en donde se clona el segmento de ADN deseado y es insertado en el huésped. Este proceso ha sido probado en varias ocasiones como lo fue con el uso del sistema luciferin/luciferasa usado en el estudio de la función de cloroplastos. (32, 34)

La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 ha sido demostrada como la cepa con más alto porcentaje de rendimiento en transformación y el menor porcentaje de plantas con una sola inserción génica en comparación con las cepas AGL1, EHA105 y MP90.(35, 36)

3.5 INTERCAMBIO GÉNICO DE CÉLULAS PROCARIOTAS

Las células procariotas son organismos unicelulares. Están formadas por citoplasma encapsulado en la membrana celular, la que está compuesta por glucopéptidos que le confieren rigidez. El citoplasma presenta una gran cantidad de ribosomas, consistentes en complejos macromoleculares de proteínas y ácido ribonucleico (ARN), siendo los centros de expresión genética debido a la capacidad de síntesis de proteínas. Este tipo de células no presenta en su interior estructuras membranosas denominadas organelos, puesto que presenta una organización simple. (37)

Además, este tipo de células no presentan núcleo definido, lo que se traduce en que su material genético, ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra disperso por el citoplasma. Este ADN se denomina cromosoma y tiene como características ser bicatenario, es decir presenta dos cadenas complementarias de ADN, y es circular.(38)

El intercambio de ADN entre células permite el intercambio de genes y características entre ellas, lo que ocasiona la aparición de cepas bacterianas nuevas. Este tipo de intercambio puede resultar favorable para el receptor, especialmente cuando se habla de una transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos o factores de virulencia.(37, 38)

Los genes pueden ser intercambiados entre células de manera natural o artificial. Dichos procesos de intercambio se denominan conjugación, transducción y transformación.

El sistema de transferencia mediante conjugación requiere que exista contacto directo entre las células en las que se producirá el intercambio genético, además de ser necesario que las bacterias involucradas sean de tipo sexual opuesto. Para este proceso es necesaria la presencia de una bacteria donante y una receptora, en donde la donante es la que presenta el plásmido que será transferido a la bacteria receptora que no lo posee.(39)

La transducción implica la presencia de un bacteriófago que es capaz de movilizar material genético bacteriano y transportarlo hacia otras células bacterianas. Finalmente, la transformación involucra la adquisición de ADN "desnudo" a partir de un ambiente extracelular.(40)

El proceso de transformación involucra transferencia de genes "desnudos" presentes en una solución. Existen bacterias que realizan este proceso de manera natural, como lo confirma el experimento realizado en 1928 con cepas de *Streptococcus pneumoniae*, una cepa virulenta con cápsula y una avirulenta, sin cápsula. En este experimento se demostró que la exposición de material genético libre proveniente de las cepas virulentas, podía ser incorporado por bacterias que no contenían esos genes de virulencia, otorgándole esa característica por medio de la transformación. (38, 41)

No todas las bacterias son capaces de ser transformadas de manera natural. Esto está determinado por la presencia de una proteína llamada factor de competencia. Es por esto que se han creado protocolos de trabajo en los cuales se recrea este fenómeno de manera artificial. Para ello se necesita lograr un estado de "competencia" de las bacterias, lo que involucra la exposición a soluciones con concentraciones elevadas de cationes divalentes, como el calcio. (42) Este paso es necesario para aumentar la permeabilidad de la membrana, permitiendo que genes o plásmidos, ingresen al citoplasma bacteriano. Este proceso también involucra choques térmicos, lo que en conjunto aumenta la permeabilidad de la membrana celular facilitando así la entrada de los plásmidos. Genes en conformación lineal tienen mucha más dificultad para ingresar a la membrana que aquellos circulares como lo son los plásmidos.(43) El choque térmico se logra mediante la incubación en hielo de las células competentes en adición del catión divalente, y luego rápidamente suspender los viales a 42°C por un pequeño lapso de tiempo. A continuación la suspensión en hielo permite el cierre de los poros, lo que asegura que los plásmidos que lograron introducirse queden dentro de la célula.(40, 43)

3.6 PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena que se encuentran en variadas especies bacterianas, siendo de carácter extracromosomal. (18) Estos plásmidos contienen información genética que no es de vital importancia para la bacteria, por lo que se replican de forma independiente del resto del cromosoma bacteriano. El tamaño de estos plásmidos es bastante menor al del cromosoma, pudiendo existir en una misma célula varios plásmidos. (29)

Aunque la información almacenada en los plásmidos no es de vital importancia para la bacteria, presentar plásmidos puede conferir ciertas ventajas para el microorganismo, como puede ser la adquisición de una resistencia antimicrobiana, factores de virulencia, etc. (20, 29)

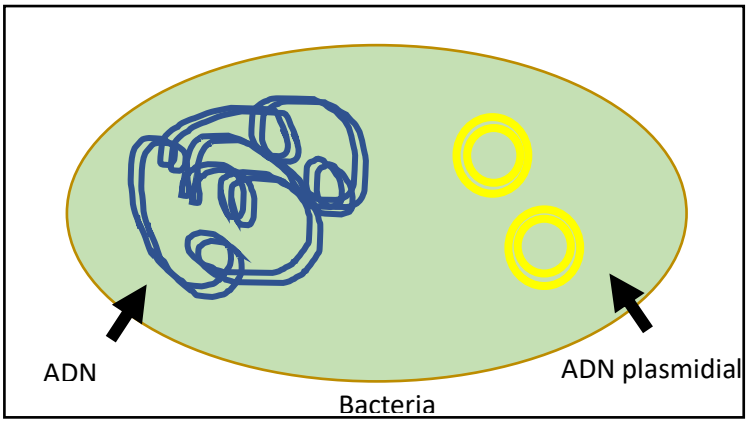

Figura 2. Representación gráfica de plásmidos dentro de un microorganismo. Bárbara Rojas Núñez, elaboración propia.

3.7 ESTÁNDARES DE CALIDAD NACIONAL E INTERNACIONALES

La *International Organization for Standardization* (ISO) es una organización no gubernamental que cuenta con la participación de 162 países, en donde a través de sus miembros se desarrollan los consensos de estándares internacionales para fomentar la innovación y promover la ciencia. Esta organización tiene como fin la estandarización para productos, procesos, servicios y sistemas para asegurar calidad, seguridad y eficiencia.(44)

Uno de los miembros de esta organización es el Instituto Nacional de Normalización (INN), perteneciente a Chile. Este instituto tiene como función la elaboración de normas técnicas nacionales, aseguramiento de la trazabilidad de las mediciones, así como también la impartición de cursos y diplomados para la entrega de conocimientos y herramientas en base a normas técnicas estandarizadas.(23)

La recomendación para los laboratorios de distintos ámbitos en Chile es trabajar bajo la norma NCH-ISO 17025:2005, ya que es útil para cualquier laboratorio que realice mediciones o calibraciones deseando resultados confiables y asegurando la calidad del laboratorio. (23, 44)

La norma ISO 17025 consta de cinco cláusulas, dos anexos y una sección de bibliografía. Los requisitos de esta norma contemplan la elaboración e implantación de un manual de calidad, políticas de gestión y técnicas, incluidas una política de calidad, procedimientos de gestión y técnicos, además de la generación de evidencia objetiva y su implementación a modo de registros de gestión y técnicos. Esto involucra la generación de protocolos de control de calidad y manuales de procedimientos que permitan la estandarización de las técnicas, pudiendo ser aplicadas a cualquier ámbito del laboratorio, como lo es la implementación y mantenimiento de un cepario. (22)

Dentro del sistema de gestión debe haber políticas, procedimientos estándar e instrucciones de trabajo para asegurar la calidad de los resultados de los ensayos, además de mejorar continuamente la efectividad del sistema de gestión. Además, se debe tener en cuenta que todos los documentos oficiales deben ser autorizados y controlados, en conjunto con ser revisados periódicamente y ser actualizados de ser necesario.(22, 44)

4. HIPÓTESIS

La implementación de protocolos de trabajo, actualización y mejora de los registros y métodos de almacenamiento del cepario del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Frutos de la Universidad de Talca serán suficientes para el correcto manejo de las cepas de trabajo que poseen.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJTIVO GENERAL

Implementar protocolos de trabajo y documentos de registro de acuerdo a requerimientos del laboratorio y estándares de calidad para optimizar el trabajo con ceparios de Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Frutos de la Universidad de Talca.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Actualizar sistema de almacenamiento de cepas de trabajo ya existentes en el laboratorio.
- Implementar protocolos de resiembra y almacenamiento para cada cepa de trabajo.
- Implementar registros de trabajo y documentos de almacenamiento para cada cepa de trabajo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CEPAS DISPONIBLES

Las bacterias utilizadas para la actualización y mejoramiento del cepario bacteriológico corresponden a cepas de creación propia del FBMF de la Universidad de Talca. Éstas se encuentran clasificadas según su uso.

6.1.2 CEPAS DE ALMACENAMIENTO PERMANENTE

Tabla 1. Plásmidos ensayo promotores

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmidos	Construcción	Resistencia
pDONR221 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	pDONR221	-	*ccdB*, KAN, CFL
pMDC162 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	pMDC162	-	*ccdB*, KAN, CFL, HG
pB2GW7 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	pB2GW7	-	*ccdB*, SPE
p2GWF7 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	p2GWF7	-	*ccdB*, CAR
pGWB5050 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	pGWB5050	-	*ccdB*, KAN, SPE

ccdB: Control of cell death/Toxina-B; KAN: kanamicina; CFL: cloranfenicol; HG: higromicina; SPE: spectinomicina; CAR: carbenicilina.

Tabla 1. Continuación. Plásmidos ensayo promotores.

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmidos	Construcción	Resistencia
pBI121 2T1R	*Escherichia coli*	2T1R	pBI121	35S::GUS	KAN
pBL121 DH5α	*Escherichia coli*	DH5α	pBI121	35S::GUS	KAN

ccdB: Control of cell death/Toxina. 35S: promotor. GUS: gen. KAN: kanamicina; CFL: cloranfenicol; HG: higromicina; SPE: spectinomicina; CAR: carbenicilina.

Tabla 2. Plásmidos ensayo agroinfiltración.

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmidos	Construcción	Resistencia
505::GUSf	*Escherichia coli*	DH5α	pGWB505	35S::GUSfull	SPE
505::MYC2	*Escherichia coli*	DH5α	pGWB505	35S::FaMYC2	SPE
505::JAZ1Δ	*Escherichia coli*	DH5α	pGWB505	35S::FaJAZ1Δ	SPE
WIW::GUSi	*Escherichia coli*	DH5α	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	SPE
WIW::FaCOI1i	*Escherichia coli*	DH5α	pH7GWIWWG2 (II)	35S::COI1i	SPE
505::GUSf (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::GUSfull	RIF, GEN, SPE
505::GUSf (2)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::GUSfull	RIF, GEN, SPE
505::MYC2 (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaMYC2	RIF, GEN, SPE
505::MYC2 (2)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaMYC2	RIF, GEN, SPE

SPE: spectinomicina; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina. 35S: promotor. GUSf: gen completo; MYC2: gen; JAZ1Δ: gen; GUSi: gen incompleto; FaCOI1i: gen incompleto.

Tabla 2. Continuación. Plásmidos ensayo agroinfiltración.

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmido	Construcción	Resistencia
505:: JAZ1Δ (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaJAZ1Δ	RIF, GEN, SPE
505:: JAZ1Δ (2)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaJAZ1Δ	RIF, GEN, SPE
WIW::GUSi (2)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	RIF, GEN, SPE
WIW::GUSi (3)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	RIF, GEN, SPE
WIW::FaCOI1i (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::COI1i	RIF, GEN, SPE
WIW::FaCOI1i (2)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::COI1i	RIF, GEN, SPE
WIW::FaCOI1i (3)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::COI1i	RIF, GEN, SPE
505::GUSf	*Escherichia coli*	-	pGWB505	35S::GUSfull	SPE
505::MYC2 (1)	*Escherichia coli*	-	pGWB505	35S::FaMYC2	SPE
505::MYC2 (1)	*Escherichia coli*	-	pGWB505	35S::FaMYC2	SPE

RIF: rifampicina; SPE: spectinomicina; GEN: gentamicina. 35S: promotor. JAZ1Δ: gen; GUSi: gen incompleto; FaCOI1i: gen incompleto; GUSf: gen completo; MYC2: gen.

Tabla 3. Plásmidos de trabajo (bacterias).

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmido	Construcción	Resistencia
pDONR221	*Escherichia coli*	2T1R	pDONR221	-	*ccdB;* KAN, CFL
pMDC162	*Escherichia coli*	2T1R	pMDC162	-	*ccdB,* KAN, CFL, HIG

*ccdB:*Control of cell death/Toxina- KAN: kanamicina; CFL: cloranfenicol; HIG: higromicina; SPE: spectinomicina; CAR: carbenicilina.

Tabla 3. Continuación. Plásmidos de trabajo (bacterias).

Nombre	Bacteria	Cepa	Plásmido	Construcción	Resistencia
pB2GW7	*Escherichia coli*	2T1R	pB2GW7	-	*ccdB,* SPE
p2GWF7	*Escherichia coli*	2T1R	p2GWF7	-	*ccdB,* CAR
pGWB505	*Escherichia coli*	2T1R	pGWB505	-	*ccdB,* KAN, SPE
pBI121	*Escherichia coli*	DH5α	pBI121	-	KAN
505::GUSf	*Escherichia coli*	DH5α	pGWB505	35S::GUSfull	SPE
505::MYC2	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaMYC2	SPE
505::JAZ1 Δ	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pGWB505	35S::FaJAZ1Δ	SPE
WIW::GUSi (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	SPE
WIW::FaCOI1i (1)	*Agrobacterium tumefaciens*	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::COI1i	SPE

ccdB: Control of cell death/Toxina- KAN: kanamicina; CFL: cloranfenicol, HIG: higromicina, SPE: spectinomicina, CAR: carbenicilina.

6.2 ANTIBIÓTICOS

Para la evaluación de características genotípicas de las cepas a estudiar se utilizaron diversos antibióticos como kanamicina, spectinomicina, carbenicilina, gentamicina y rifampicina (tabla 4).

Tabla 4. Antibióticos, concentración utilizada y laboratorio de origen.

Antibiótico	Concentración (ug/mL)	Laboratorio de origen
Kanamicina (KAN)	50	Duchefa Biochemic®
Spectinomicina (SPE)	50	Duchefa Biochemic®
Carbenicilina (CAR)	50	Duchefa Biochemic®
Gentamicina (GEN)	25	Duchefa Biochemic®
Rifampicina (RIF)	100	Duchefa Biochemic®

6.3 PREPARACIÓN ANTIBIÓTICOS

Para la preparación de los antibióticos se realizaron los cálculos necesarios para preparar alícuotas en donde la concentración fuese de 1000x. Para ello se masó los antibióticos en polvo en una balanza electrónica cerrada (BOECO Germany®) y se disolvieron en agua (kanamicina, spectinomicina, carbenicilina, gentamicina) y en alcohol 80% (rifampicina). Luego los antibióticos fueron dispensados en microtubos ámbar de 2,0 mL (Eppendorf®), previamente filtrados con filtros millipore en una cantidad 1,5mL en cada microtubo. Todo este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar con certificación y validación según estándares Federales 209B y 209E, ISO 14644-1, trazable al *National Institute of Standars and Technology* (NIST) con un mechero de alcohol dentro. Una vez finalizado este proceso, los microtubos fueron sellados con papel Parafilm M® (Sigma Aldrich), y rotulados con etiquetas de papel adhesivo en donde se informa antibiótico, concentración, fecha de elaboración y persona encargada de su preparación. Una vez completado este paso, fueron almacenados en cajas de congelador de cartón (Cryo King, Biologix®) a una temperatura de -20°C en un congelador convencional. Hay que considerar que el antibiótico rifampicina debe ser almacenado en oscuridad.

6.4 MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado para estos ensayos es el caldo Luria (LB Broth, MO BIO), el cual fue preparado de dos maneras diferentes para ser utilizados en distintos procesos de siembra. Así como también se utilizó agar-agar (Bacto™ Agar, BD), adicionado a caldo LB para su solidificación.

6.4.1 MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

Primero, se preparó la primera partida de caldo LB líquido de manera que se masó la cantidad establecida por el fabricante, ajustada a la cantidad de medio que se utilizará, en una balanza electrónica cerrada (BOECO Germany®). Esta cantidad luego fue suspendida en agua destilada en un frasco (Schott) de volumen variable según cantidad a preparar, el cual fue autoclavado según indicaciones del fabricante con cinta para autoclave de control externo químico. Cuando no fue utilizado inmediatamente este fue almacenado a 4°C según indicaciones del fabricante.

6.4.2 MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO CON ANTIBIÓTICOS

Para la preparación de las placas que fueron utilizadas, se masó la cantidad de caldo LB establecida por el fabricante, ajustado a la cantidad de placas que fueron utilizadas, en una balanza electrónica cerrada (BOECO Germany®), también se masó la cantidad necesaria de agar-agar, ajustado a la cantidad de placas. Ambos componentes fueron suspendidos en agua esterilizada en un frasco (Schott) de volumen determinado según cantidad a preparar y se añadió una barra agitadora magnética. Esto se llevó al autoclave según indicaciones del fabricante con cinta para autoclave de control externo químico. Una vez terminado esto, se procedió a la preparación de las placas. Para ello se utilizó una cámara de flujo laminar con

certificación y validación según estándares Federales 209B y 209E, ISO 14644-1, trazable al NIST con un mechero de alcohol dentro. Al medio de cultivo se le adicionó la cantidad de antibiótico necesaria para que la concentración fuese la deseada ajustando a la cantidad de medio preparado a una relación 1µL de antibiótico líquido/1mL de medio de cultivo, el cual fue dispensado con una micropipeta de 1000mL (Thermo SCIENTIFIC®). Posterior a esto se puso el frasco (Schott) en un agitador magnético para homogenizar la mezcla.

Se utilizaron placas Petri estériles redondas de medidas 90X15mm de poliestireno (Ltech Chile) las que se llenaron con aproximadamente 20mL de medio de cultivo cada una. Una vez terminado este proceso, se sellaron con papel Parafilm M y rotuladas con marcador indicando el antibiótico adicionado, la fecha de elaboración y encargado de la preparación. Luego fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización. Hay que considerar que las placas suplementadas con rifampicina fueron almacenadas en oscuridad.

6.5 GLICEROL

Se utilizó glicerol (SIGMA®), el cual fue preparado a una concentración 50% v/v con agua destilada en un frasco (Schott) y luego autoclavado según estándares de laboratorio.

6.6 PRIMERA RESIEMBRA

La primera resiembra consiste en la siembra de las cepas almacenadas. En este caso, las cepas se encontraban almacenadas en un ultra-congelador (Haier BIO- MEDICAL), a -80°C en una suspensión de caldo LB con glicerol al 50%. Para comenzar la siembra se tomaron dos microtubos por cada cepa almacenada, los que se pusieron en hielo para ser transportadas al laboratorio de trabajo.

Para la primera resiembra se utilizaron tubos Falcon® de 15 mL con 2 mL de caldo LB líquido los cuales se inocularon con 500 µL de la suspensión bacteriana, haciéndolo por duplicado para cada microtubo de cada cepa. Todo este proceso fue realizado en un mesón esterilizado con alcohol al 70% y mechero Bunsen encendido.

Estas preparaciones fueron incubadas en una estufa de calor seco (BIOBASE, modelo BJPX- N50), por aproximadamente 24H a 37°C para cepas *Escherichia coli* y a 28°C para *Agrobacterium tumefaciens*. Junto con las muestras se incorporó un control negativo consistente en caldo LB sin inocular. A las 24H se hizo una inspección visual de turbidez para evidenciar o no crecimiento bacteriano.

6.7 CONFIRMACIÓN DE PROPIEDADES GÉNETICAS DE LA CEPA

Con el crecimiento obtenido de la primera resiembra, se procedió a la inoculación de las placas adicionadas con antibióticos. Para esto se tomó la placa con el antibiótico para el cual la cepa presenta una resistencia y se inoculó con 20 µL de la suspensión previa. Posterior a esto se procedió a realizar la siembra con un asa bacteriológica de metal, realizando estrías para aislamiento de colonias.

Una vez que todas las cepas en estudio estuvieron sembradas correctamente, fueron incubadas en la estufa a 37°C para *Escherichia coli* y a 28°C para *Agrobacterium tumefaciens,* por aproximadamente 24H. Junto a las muestras se incorporó un control negativo correspondiente a una placa de medio de cultivo inoculado con el control negativo del paso anterior. Pasadas las 24H se realizó una inspección visual de las placas para evidenciar crecimiento bacteriano.

6.8 CONFIRMACIÓN DE CEPAS

Al observar crecimiento bacteriano en las placas adicionadas con antibióticos se confirmó que la cepa en estudio presenta el plásmido que indica en los registros con la resistencia antibiótica especificada y de esta manera se procedió a almacenarla.

6.9 ALMACENAMIENTO DE CEPAS

Para realizar el almacenamiento de las cepas en estudio se requiere la realización de una suspensión bacteriana. Para ello se utilizaron 1,5 mL de caldo LB, el cual fue adicionado sobre el crecimiento bacteriano de la placa, en donde se homogenizó con ayuda del asa bacteriológica hasta alcanzar una turbidez 3-4 McFarland aproximadamente.

Luego se adicionaron 500 µL de glicerol 50% V/V en un microtubo transparente y 500 µL de la suspensión bacteriana preparada. Luego los microtubos fueron sellados con papel Parafilm M y rotulados con cinta adhesiva describiendo fecha de almacenamiento y código de las cepas en cuestión. Todos los microtubos preparados a esta concentración fueron almacenados en una caja de cartón criogénica (Cryo King), la cual también se rotuló con códigos de su contenido, en el congelador a -80°C.

De manera paralela se adicionaron 300 µL de glicerol 50% y 500 µL de la suspensión bacteriana preparada a un microtubo transparente de 1,5 mL. Luego los microtubos fueron sellados con papel Parafilm M y rotulados con cinta adhesiva describiendo fecha de almacenamiento y código de las cepas en cuestión. Todos los microtubos preparados a esta concentración fueron almacenados en una caja de cartón criogénica (Cryo King), la cual también fue rotulada con códigos de su contenido, en el congelador a -20°C.

6.10 ANÁLISIS DE MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Para analizar si los métodos de almacenamiento seleccionados fueron suficientes y atingentes, se procedió a realizar el mismo proceso de resiembra descrito anteriormente para evaluar crecimiento, pureza y características genotípicas de las cepas en estudio.

Para las cepas almacenadas a -80°C la resiembra fue realizada pasado 3 meses desde su almacenamiento inicial, mientras que para aquellas almacenadas a -20°C la resiembra se realizó 1 mes posterior a su almacenamiento.

6.11 ELABORACIÓN DE PROTOCOLO DE RESIEMBRA Y DOCUMENTOS DE ALMACENAMIENTO

Para la elaboración del protocolo de resiembra se consultó literatura, como lo es "WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS GUIDELINE FOR THE ESTABLISHMENT AND OPERATION OF COLLETCIONS OF CULTURE OF MICROORGANISMS" (WFCC) 3° edición del año 2010, y diversas fuentes citadas con anterioridad, además de su adaptación a las condiciones y requerimientos del FBMF mediante el análisis de los resultados obtenidos de los ensayos realizados. Así como también se utilizó la literatura y los requerimientos del laboratorio para la realización de la documentación necesaria para tener el registro de las cepas almacenadas de manera accesible y con información relevante para los funcionarios que empleen dichas cepas almacenadas.

7. RESULTADOS

7.1 PRIMERA RESIEMBRA

Cepas que fueron resembradas desde su almacenamiento a -80°C, sembradas en caldo LB líquido, sin suplementar e incubadas a 37°C por 24H (tabla 5). El análisis de crecimiento se realizó de manera visual mediante la observación de turbidez presentada en los tubos.

Tabla 5. Escala de crecimiento bacteriano en suspensión y medio sólido

Tipo de Crecimiento	Escala McFarland (Medio líquido)	UFC/µL (Medio sólido)
Crecimiento óptimo (CO)	≥ 2	$\geq 10^5$
Crecimiento adecuado (CA)	$\geq 1; <2$	$\geq 10^3 - < 10^5$
Crecimiento pobre (CP)	$\geq 0,5 - < 1$	$\geq 10^{2\,-} < 10^3$
Sin Crecimiento (SCr)	0	0
Sin Contaminación (SC)	-*	Presencia de colonias con sólo una morfología.
Contaminación (PC)	-*	Más de una colonia morfológicamente diferente. O crecimiento de cualquier colonia en control negativo.

*: No puede realizarse diferenciación entre contaminación o no contaminación sólo con inspección visual.

Los resultados obtenidos en la primera resiembra de las cepas de trabajo en medio líquido (tabla 6), mostró un crecimiento óptimo de las cepas de *Escherichia coli* luego de 24H de incubación a 37°C. El resultado del control negativo fue óptimo para continuar con el procedimiento.

Tabla 6. Resultados primera resiembra cepas de trabajo. Medio líquido

Bacteria	Cepa	Plásmido	Repeticiones	Resultado
Escherichia coli	2T1R	p2GWF7	2	CO
Escherichia coli	2T1R	pGWB505	2	CO
Escherichia coli	2T1R	pB2GW7	2	CO
Control negativo	-	-	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. CA: Crecimiento adecuado. CP: Crecimiento pobre. SCr: Sin crecimiento.

Los resultados obtenidos en la primera resiembra de las cepas de trabajo en medio líquido (tabla 7), mostró un crecimiento óptimo de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* luego de 72H de incubación a 28°C. El resultado del control negativo fue óptimo para continuar con el procedimiento.

Tabla 7. Resultados primera resiembra cepas de trabajo. Medio líquido

Bacteria	Cepa	Plásmido	Construcción	Repeticiones	Resultado
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pGWB505	35S::GUSfull	2	CO
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pGWB505	35S::FaMYC2	2	CO
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	2	CO
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pH7GWIWWG2(I)	35S::GUSi	2	CO
Control	-	-	-	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. SCr: Sin crecimiento. Construcción: Gen presente en plásmido.

7.2 ANÁLISIS CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE LAS CEPAS

Los resultados obtenidos en la siembra por aislamiento realizados en medio de cultivo sólido con la adición de los antibióticos correspondientes muestran un crecimiento óptimo de las cepas de *Escherichia coli* posterior a 24H de incubación a 37°C (tabla 8). El control negativo fue el esperado.

Tabla 8. Resultados siembra por aislamiento.

Bacteria	Cepa	Plásmido	Antibiótico	Repeticiones	Resultado
Escherichia coli	2T1R	p2GWF7	CAR	2	CO, SC
Escherichia coli	2T1R	pGWB505	KAN, SPE	2	CO, SC
Escherichia coli	2T1R	pB2GW7	SPE	2	CO, SC
Control negativo	-	-	KAN, SPE, CAR	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. SCr: Sin crecimiento. SC: Sin contaminación. SPE: Spectinomicina. KAN: Kanamicina. CAR: Carbenicilina.

Los resultados obtenidos en la siembra por aislamiento realizados en medio de cultivo sólido con la adición de los antibióticos correspondientes muestran un crecimiento óptimo de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* posterior a 72H de incubación a 28°C (tabla 9). El control negativo obtuvo el resultado esperado.

Tabla 9. Resultados siembra por aislamiento.

Bacteria	Cepa	Plásmido	Construcción	Antibióticos	Repeticiones	Resultado
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pGWB505	35S::GUSfull	RIF, SPE, GEN	2	CO, PC
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pGWB505	35S::FaMYC2	RIF, SPE, GEN	2	CO, PC
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pH7GWIWG2(I)	35S::GUSi	RIF, SPE, GEN	2	CO, PC
Agrobacterium tumefaciens	GV3101	pH7GWIWG2(I)	35S::GUSi	RIF, SPE, GEN	2	CO, PC
Control negativo	-	-	-	RIF, SPE, GEN	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. SCr: Sin crecimiento. PC: Presenta contaminación. RIF: Rifampicina, SPE: Spectinomicina. GEN: Gentamicina. Construcción: gen presente en plásmido.

7.3 ANÁLISIS MÉTODO DE ALMACENAMIENTO

Para la confirmación de la eficacia del método empleado se realizó una segunda resiembra para confirmación de viabilidad de las cepas almacenadas. Las cepas almacenadas a -20°C fueron resembradas luego de 1 mes de almacenamiento.

Los resultados obtenidos a partir de la repetición del procedimiento con las cepas de *Escherichia coli* almacenadas previamente fue de un crecimiento óptimo en medio líquido (tabla 10). El resultado del control negativo fue el esperado para continuar con el procedimiento.

Tabla 10. Resultados análisis método de almacenamiento medio líquido.

Bacteria	Cepa	Plásmido	Repeticiones	Resultado
Escherichia coli	2T1R	p2GWF7	2	CO
Escherichia coli	2T1R	pGWB505	2	CO
Escherichia coli	2T1R	pB2GW7	2	CO
Control negativo	-	-	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. CA: Crecimiento adecuado. CP: Crecimiento pobre. SCr: Sin crecimiento.

Los resultados obtenidos a partir de la repetición del procedimiento de siembra en medio sólido de las cepas de *Escherichia coli* fue el esperado, con crecimiento óptimo por parte de éstas y sin crecimiento en el control negativo (tabla 11).

Tabla 11. Resultado análisis método de almacenamiento, siembra en medio sólido.

Bacteria	Cepa	Plásmido	ATB	Repeticiones	Resultado
Escherichia coli	2T1R	p2GWF7	CAR	2	CO, SC
Escherichia coli	2T1R	pGWB505	KAN, SPE	2	CO, SC
Escherichia coli	2T1R	pB2GW7	SPE	2	CO, SC
Control negativo	-	-	KAN, SPE, CAR	1	SCr

CO: Crecimiento óptimo. CA: Crecimiento adecuado. CP: Crecimiento pobre. SCr: Sin crecimiento. SC: Sin contaminación. PC: Presenta contaminación. SPE: Spectinomicina. KAN: kanamicina. CAR: carbenicilina.

7.4 ELABORACIÓN PROTOCOLO DE RESIEMBRA

En relación con los datos recolectados mediante las resiembras realizadas y las características del almacenamiento se realizó un protocolo de resiembra y almacenamiento para los dos tipos de microorganismos que posee el FBMF, *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens.* Ver Anexo 1.

7.5 ELABORACIÓN CÓDIGOS DE ALMACENAMIENTO

Se elaboraron códigos de almacenamiento nuevos para su correcta identificación.

7.5.1 CÓDIGO DE CEPAS

El código de la cepa es creado a partir de las características más relevantes de la bacteria. Por cada cepa mencionada anteriormente se encuentran numerosas copias, por lo que para generar un nuevo código aplicable a todas las cepas actuales y futuras del laboratorio se comenzó desde el número 0001. El código comienza con las iniciales de la familia y género de la bacteria, por lo que *Escherichia coli* sería EC y *Agrobacterium tumefaciens* es AT. Esas dos letras son el comienzo del código. Luego se toman los 3 últimos caracteres del plásmido que contienen. Finalmente, se agrega un guion medio y el número de 4 dígitos correspondiente a la cepa. El código tipo es: ECXXX-0001.

7.5.2 CÓDIGO CAJAS CRIOGÉNICAS

A las cajas criogénicas utilizadas se les aplicó también un código, el que se encuentra presente en el exterior de ellas. Este código está basado en el almacenamiento por cepa de cada microorganismo.

7.6 ELABORACIÓN DOCUMENTO DE REGISTRO DE CEPAS

Con los datos recolectados de cada cepa se analizó la información relevante del FBMF en conjunto con las recomendaciones de la *World Federation of Culture Collections,* creando así un documento que contenga toda la información acerca de la cepa a trabajar. Dentro de los datos a llenar en el registro se encuentra el código de la cepa, previamente mencionado, más información que ya se encuentra disponible en distintos formatos dentro del laboratorio.

Dentro de la información de almacenamiento se encuentra también solicitado el código de la caja criogénica en la que se encuentran almacenadas las cepas, el cual también fue generado previamente.

Este documento de registro se almacenó en la oficina del encargado del cepario del laboratorio, disponible para todo el personal que desee acceder a esta información. (Anexo 2)

8. DISCUSIÓN

Los cepario son una parte fundamental de los laboratorios de investigación, docencia y clínica debido a todas las metodologías de trabajo en donde bacterias con ciertas características fenotípicas y genotípicas son parte del protocolo. Esto se ve aplicado fuertemente en los laboratorios clínicos de microbiología en donde las técnicas de susceptibilidad a antibióticos requieren cepas de referencia para validar los resultados.(2, 45)

Estas cepas de referencia, son adquiridas de manera comercial, las que son distribuidas por entidades acreditadas. Esto en Chile está altamente regulado por parte del ISP y las guías de trabajo de laboratorio para asegurar la calidad. (46)

Pero no es solo en el ámbito clínico en donde las cepas de referencia tienen un fuerte impacto, sino que también en la biología molecular. Es aquí donde también tienen un papel muy importante puesto que todas estas técnicas requieren materiales altamente certificados y caracterizados para obtener los resultados más óptimos en investigación y docencia. (7)

La implementación de un cepario no es fácil, ya que no existen guías oficiales con protocolos de trabajo determinados. Existen algunas recomendaciones por parte de entidades internacionales que a pesar de ser accesibles para todo público, no son de conocimiento colectivo. Por lo que al comenzar un cepario, al inicio no están claros los requerimientos para ello.

La WFCC tiene pautas de manejo de cepario, pero están enfocadas mayormente para laboratorios más grandes, y con el almacenamiento de cepas de referencia en mente. Sin

embargo, cuando el FBMF comenzó a almacenar bacterias, no se tenía en mente la creación de un cepario, sino que la cantidad de bacterias almacenadas fue aumentando paulatinamente hasta el momento en que fue necesaria la implementación de protocolos de trabajo, de almacenamiento y registros de trabajo. (7, 10)

El protocolo de resiembra probado para las bacterias incluía un descongelamiento lento, por lo que al ser extraídas del ultracongelador en el que se encontraban a -80°C fueron puestas inmediatamente en hielo para disminuir la velocidad de descongelamiento y no producir lisis celular. (8, 19)

Posterior a esto, en un ambiente estéril para evitar contaminación externa, se procedió a sembrar los microorganismos contenidos en los viales en caldo Luria, el cual contiene peptona de caseína y extracto de levadura, lo que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de los microorganismos. También contiene cloruro de sodio, lo que permite mantener el equilibrio osmótico. Esto se incuba en estufa de calor seco según las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo. En el caso de *Escherichia coli,* su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C por 24H hasta alcanzar su fase estacionaria, mientras que para *Agrobacterium tumefaciens* es a 28°C por 3 días. (26, 32, 47)

La fase estacionaria es aquella en donde el microorganismo ha alcanzado la máxima capacidad de crecimiento, agotando los recursos del medio en el que se encuentran, por lo que existe una inhibición en el crecimiento bacteriano. Es en este momento en el que la segunda resiembra debe hacerse para asegurarse de que las bacterias se encuentran en un estado metabólico disminuido y no sufrirán mayor estrés al congelamiento al existir una disminución del metabolismo paulatino.(48)

Esta primera resiembra en medio líquido sin antibióticos se realiza para obtener la máxima recuperación del microorganismo luego de haber estado almacenado en condiciones no óptimas para su desarrollo como lo es la congelación. En este paso la esterilidad es muy importante, puesto que el medio de cultivo en el cual se están desarrollando las bacterias no contiene antibióticos, lo que resulta en una posible contaminación más fácil de la que tendría si el medio estuviera suplementado con antibióticos. (37, 42, 48)

Otro punto crítico dentro de este paso es el control negativo que se incluye en la incubación, el cual sólo contiene el medio de cultivo en el cual los microorganismos fueron inoculados. Esto se realiza con el fin de asegurar una vez más la esterilidad del cultivo así como también que la metodología de trabajo y esterilidad haya sido la correcta durante el procedimiento.

Una vez que termina la primera incubación de los microorganismos la inspección visual de la turbidez de los tubos es una ayuda en la determinación del crecimiento bacteriano. Esto podría hacerse por medio de espectrofotometría, midiendo la turbidez por medio de un espectrofotómetro. Este equipo es de uso común en los laboratorios y lo que hace es medir la densidad óptica, es decir la absorbancia, que es una medida de la luz dispersada o transmitida a través de una suspensión, siendo directamente proporcional a la concentración del analito a medir. Sin embargo, en este ensayo se realizó solo la inspección visual, otorgando resultados óptimos en la determinación del crecimiento, pudiéndose observar en todos los tubos (ver tabla 6 y 7) al comparar su turbidez con el estándar de densidad McFarland (considerando que una turbidez de 2 McFarland corresponde a 6 $x10^8$ UFC/µL). (49, 50)

Cuando el crecimiento bacteriano fue confirmado en los tubos, se procedió a realizar una siembra por aislamiento en medios de cultivo sólidos, que contenían caldo Luria, agar-

agar y el antibiótico al cual son resistentes los microorganismos en relación al plásmido que contienen.

Esto se realizó para confirmar que la bacteria que se encontraba almacenada fuera la que se indicaba, además de confirmar que mantuvo sus propiedades genotípicas de resistencia otorgada por el plásmido contenido durante su almacenamiento.

Aquí los resultados obtenidos para las cepas de *Escherichia coli* fueron los esperados. Esto se determinó ya que al ser sembradas con 20 µL de suspensión bacteriana las colonias resultantes luego de 24H de incubación a 37°C eran incontables dentro de la placa, lo que indica un crecimiento mayor a 10^5 UFC/µL. De acuerdo a la literatura, la presencia de crecimiento en placa con antibióticos es suficiente para confirmar la cepa almacenada, sin embargo, también se puede realizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR), confirmando así la presencia del plásmido por métodos moleculares.(19, 40)

Al ser confirmadas las cepas de *E. coli*, estas pudieron ser almacenadas según protocolos investigados en la literatura, en donde la recomendación es la utilización del proceso de congelación ordinaria y congelación ultrafría, ya que son los almacenamientos que tienen mayor rendimiento, así como también tienen la ventaja de no necesitar equipamiento demasiado especializado, como podría ser la congelación mediante nitrógeno líquido o la liofilización.(11, 15)

En el caso de *Agrobacterium tumefaciens* el crecimiento en las placas no fue el esperado, puesto que al momento de visualizar las colonias bacterianas presentaba dos tipos diferentes, lo que indica una contaminación. El hecho de que la contaminación no haya crecido en el control negativo indica que es pertinente a los viales que contenían la bacteria. Esto puede deberse a un incorrecto almacenamiento previo de la cepa, ya que a pesar de ser considerada contaminación esta fue capaz de crecer en un medio que contenía inhibidores,

lo que indica que la cepa contaminante puede ser perteneciente a las mismas cepas almacenadas previamente en donde pudo producirse una contaminación cruzada, lo que confirma que un protocolo de resiembra es necesario, en conjunto con documentos de registro del personal que trabajó con la cepa en cuestión.

Las cepas de *E. coli* que resultaron puras y se confirmó sus características genotípicas, fueron almacenadas a dos temperatura distintas, un lote se almacenó mediante congelación ordinaria a -20°C con una concentración de glicerol a 30% aproximado, ya que a menores temperaturas la concentración de glicerol no necesita ser demasiado alta, y el otro lote fue almacenado mediante congelación ultrafría a -80°C, con una concentración de glicerol del 50%, puesto que al ser una temperatura más extrema, una mayor concentración de glicerol permite que la congelación sea a una velocidad menor y preserva la integridad de las células.(2, 15, 19)

Para confirmar que el método de almacenamiento seleccionado fue el adecuado, se utilizaron las cepas almacenadas a -20°C, ya que de acuerdo a protocolos publicados cuando las cepas se encuentran en estas temperaturas las resiembras de confirmación de viabilidad deben ser realizadas una vez cada mes, pudiendo realizarse con una muestra representativa de todas las cepas almacenadas durante el mismo periodo en las mismas condiciones. Se puede observar que las bacterias crecieron nuevamente, sin contaminación y de manera abundante, comprobando así que el método es efectivo para el almacenamiento de las cepas (ver tabla 10 y 11).

Las cepas almacenadas a -80°C no fueron probadas puesto que se recomendó no trabajar con ellas mientras exista la cepa almacenada a -20°C para así prevenir la contaminación, siendo recomendada una periodicidad de resiembra una vez cada 5 años.

Con la información recopilada en el laboratorio en conjunto con la parte experimental y literatura, se confeccionó un sistema de codificación de manera que las cepas fueran fácilmente identificables por bacteria, plásmido que contiene y el número de copia al que corresponde. En conjunto, las cajas criogénicas en las cuales se encuentran almacenadas las cepas también fueron codificadas en base a las cepas en su interior.(19, 29)

Toda esta información se recopiló en documentos de almacenamiento para su fácil acceso por el personal del laboratorio.

Las recomendaciones para el correcto manejo de un cepario y del laboratorio general están disponibles en la plataforma online de la *International Organization of Standardization,* en donde, si ellas se aplican correctamente, el funcionamiento del laboratorio será el óptimo pudiendo incluso llegar a la acreditación del FBMF, asegurando la calidad de los datos entregados por el mismo.(7, 10, 22, 44)

9. CONCLUSIÓN

La implementación para el buen funcionamiento de un cepario debe partir por las buenas prácticas de laboratorio, como lo son los protocolos de trabajo. De esta manera el trabajo se realiza de manera estandarizada independiente del personal que se encuentre trabajando en el laboratorio. Así, los resultados deberían ser siempre los mismos al trabajar bajo las mismas condiciones.

El método de almacenamiento por congelación ordinaria y congelación ultrafía probaron ser eficaces y eficientes para el correcto almacenamiento de las cepas pertenecientes al FBMF.

El protocolo de resiembra probó ser efectivo para la óptima recuperación de las cepas y su crecimiento, pudiendo así ser útiles para el trabajo del laboratorio.

Las recomendaciones de calidad proveniente de la ISO son comercializadas, por lo que el acceso a esta información está restringido a aquel público que no cuenta con los recursos para pagar por ella, lo que dificulta el proceso de mejoramiento de la calidad de los laboratorios y entorpeciendo el crecimiento de la ciencia. Es por esto que las recomendaciones para el manejo de cepario debieran ser estandarizadas y liberadas al público por parte de entidades chilenas como lo es el *Instituto Nacional de Normalización*, permitiendo así que todo aquel laboratorio que desee seguir normas de aseguramiento de calidad tenga la oportunidad de hacerlo.

Para el futuro del cepario podría realizarse un sistema informático en el cual esté almacenada toda la información de manera digital, mediante un software en donde el

personal del laboratorio pueda acceder desde cualquier dispositivo y recabar información acerca de las distintas cepas pertenecientes al FBMF.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. Res Microbiol; 2010. p. 422-429.
2. del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo MD, Carnota G, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay J Vaccimonitor; 2009. p. 18-24.
3. Board WE. World federation for culture collections guidelines. Bélgica; 2010.
4. Universidad de la Frontera. Colección Chilena de Cultivos Tipo CCCT [Available from: http://ccct.ufro.cl/.
5. Autoridad internacional de depósito. Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos Chile: CChRGM; 2018 [Available from: http://www.cchrgm.cl/.
6. Instituto de investigaciones agropecuarias. Banco de Recursos Microbianos: INIA; 2018 [Available from: http://www.inia.cl/red-de-bancos-de-germoplasma/bancos-microbianos/.
7. WFCC. Guidelines World Federation of Culture Collections 2015 [Available from: http://www.wfcc.info/guidelines/.
8. Hernández A. Microbiología Industrial. 1° ed. Costa Rica: Euned; 2003.
9. Weng Alemán Z, Esther Díaz Rosa O, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? J Revista Cubana de Higiene y Epidemiología; 2005. p. 43-51.
10. Collection American Type Culture Collection. ATCC: Ethical Standards for Obtaining Human materials; 2018 [Available from: https://www.atcc.org/en/About/About_ATCC.aspx.
11. Gutierrez J. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología; 2015. p. 35-95.
12. Meza A, Monroy AF, Mercado M, Poutou RA, Rodríguez P, Pedroza AM. Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. Universitas Scientiarum; 2004. p. 35-42.
13. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de criopreservación J Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología; 2006. p. 291-300.
14. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. J Gen Appl Microbiol; 2008. p. 9-24.
15. Arencibia D, Gámez R, Alfredo Rosario L. Métodos generales de conservación de microorganismos. 1° ed. España: Instituo Finlay; 2008.
16. da Silva GP, Mack M, Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol Adv; 2009. p.27-39.
17. Hernández D LA. Selección de unmétodo para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2014.
18. Pérez-Reytor DC, Sosa Espinosa AE. Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología J Vaccimonitor; 2010. 19:11-7.
19. Chalmers DD, Joakim; Et al. Methods in biobanking. 1° ed. Walker J, editor. United Kingdom: Humana Press; 2011.
20. de la Rosa Fraile M, Prieto JP. Microbiología en ciencias de la salud: conceptos y aplicaciones: Elsevier; 2003.
21. Acosta Gomez A. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología: Pontificia Universidad Javeriana; 2006.

22. García G. Norma ISO 17025. Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayos y calibración Ministro publico Perú; 2012. [Available from: https://www.mpfn.gob.pe/escuela/contenido/actividades/docs/3255_norma_iso_17025._minpub.pdf.
23. Instituto Nacional de Normalización. Laboratorio de análisis y calibración. Análisis e implementación: INN; 2018. [Available from: http://www.inn.cl/nch-iso170252005-laboratorios-de-ensayo-y-calibracion-analisis-e-implementacion.
24. Cuesta A. Aseguramiento de la calidad. Cultivos de referencia Norma ISO 17025 Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; 2010. [Available from: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg4.pdf.
25. Daegelen PS, William; Et al. Tracing ancestors and relatives of Escherichia coli B, and the derivation of B strains REL606 and BL21. Journal of molecular biology; 2009. p. 634-643.
26. Ullmann A. Escherichia coli and the Emergence of Molecular Biology. EcoSal Plus; 2011. p. 16-25.
27. Russo E. Special Report: The birth of biotechnology. Nature; 2003. p. 421-456.
28. Bachmann BJ. Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. Bacteriological reviews; 1972. p. 525-557.
29. Concepción, J; Puerta B. Prácticas de biología molecular: Pontificia Universidad Javeriana; 2005.
30. Zhang TC, Nakajima M. Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume I: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
31. Invitrogen. One Shot™ OmniMAX™ 2 T1R Chemically Competent E. coli: Thermo Fisher Scientific; 2004 [Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C854003.
32. de la Riva GG-C, Joel. Et al. Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation. Electronic Journal of Biotechnology; 1998. p. 17-30.
33. Hwang HH, Gelvin SB, Lai EM. Editorial: "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". Frontiers in plant science; 2015. p. 256-265.
34. Montagu VJ, Schell J. The Ti-Plasmid o fAgrobacterium tumefaciens, a natural vector for the introduction of NIF genes in plants? Basic Life Sciences; 1977. p. 234-244.
35. Chetty VJ, Ceballos N, Garcia D, Narvaez-Vasquez J, Lopez W, Orozco-Cardenas ML. Evaluation of four Agrobacterium tumefaciens strains for the genetic transformation of tomato (Solanum lycopersicum L.) cultivar Micro-Tom. Plant cell reports; 2013. p. 32-47.
36. Valderrama F. AI. Plant transformation mediated by Agrobacterium: "applied natural genetic engineering". Revista facultad nacional agronomía Medellín. 2005;58(1):2569-005.
37. Pírez M, Mota MJRei. Morfología y estructura bacteriana; 2000. p. 23-42.
38. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología: Panamericana; 2007.
39. Voet D, Voet JG. Bioquímica: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006.
40. Forbes BA. Diagnostico Microbiologico: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2009.
41. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. Journal of experimental medicine; 1944. p. 79-137.
42. Stanier RY, Villanueva JR. Microbiología: Reverté; 1996.
43. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. Nature Reviews Microbiology; 2004. p. 222-241.

44. International Organization of Standardization. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories: ISO; 2017 [Available from: https://www.iso.org/home/standards/popular-standards/isoiec-17025-testing-and-calibra.html.
45. Public Health England. National Collection of Culture Types Public Health England; 2018 [
46. Insituto de Salud Publica de Chile. Sección Bacteriología Instituto de Salud Pública: Ministerio de Salud; 2018 [Available from: http://www.ispch.cl/biomedicos/subdepto_enf_infecciosas/bacteriologia.
47. Probiotek. Caldo Luria Probiotek 2018; [Available from: https://www.probiotek.com/productos/reactivos/caldo-luria-luria-bertani-lb/.
48. de la Rosa Fraile M, Marí JMN, Prieto JP. Microbiología en ciencias de la salud : conceptos y aplicaciones: Elsevier España, S.L.U.; 2011.
49. Harris DC, Navarro VB, Murcia ÁB. Análisis químico cuantitativo: Reverté; 2007.
50. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1: PROTOCOLO DE RESIEMBRA

PROTOCOLO RESIEMBRA CEPARIO (BACTERIAS)

Las cepas almacenadas a -20°C deben ser resembradas una vez cada tres meses para comprobar viabilidad y pureza.

Las cepas almacenadas a -80°C deben ser resembradas una vez cada cinco años para comprobar viabilidad y pureza.

MATERIALES:

- Cepa de trabajo almacenada
- Hielo
- Caldo LB (5 mL por cepa almacenada)
- Tubos Falcon® o similar de al menos 5 mL estériles (1 por cepa almacenada)
- Estufa a 37°C
- Micropipeta 1,0 mL
- Puntas plásticas estériles
- Alcohol 70%
- Placas LB sólido suplementado con antibiótico según requerimiento.
- Glicerol 50%
- Microtubos transparentes 2,0 mL
- Caja Cryo King ®

MÉTODO:

1. Sacar las cepas almacenadas a 20°C y dejar en hielo hasta el momento de utilizarlas.
2. Preparar la estación de trabajo, esta puede ser un mesón con mechero Bunsen previamente desinfectado con alcohol 70% o cámara de flujo laminar tratada previamente con luz UV y desinfectada con alcohol 70% (todo el material que entra a la estación de trabajo debe ser previamente desinfectado con alcohol).
3. Dispensar 2 mL de caldo LB en el tubo Falcon.
4. Homogenizar cepa por inversión y dispensar 500 µL de la suspensión bacteriana al tubo con el medio. Homogenizar.
5. Repetir por cada cepa a utilizar.
6. Incubar en estufa. Incluyendo control negativo consistente en caldo LB puro.
    a. *Escherichia coli* por 24H a 37°C.
    b. *Agrobacterium tumefaciens* por 72H a 28°C.
7. Pasado el tiempo de incubación, inspeccionar tubos visualmente por turbidez, lo que indica crecimiento bacteriano. En caso de que tubo control negativo presente crecimiento, repetir.
8. Preparar estación de trabajo de igual manera que punto 2.
9. Inocular 20 µl de la cepa en estudio en la placa con medio de cultivo sólido y sembrar con asa bacteriológica por aislamiento. El resto de la suspensión puede ser almacenada a 4°C y utilizarla como cepa de trabajo una vez confirmada su pureza.
10. Incubar según especificaciones de cada microorganismo, agregando una placa control inoculada con el control negativo del paso 6.
11. Pasadas 24H, inspeccionar placas visualmente en búsqueda de crecimiento de colonias representativas.
12. Adicionar 1,0 mL de caldo LB sobre la placa y emulsionar las colonias hasta tener una suspensión 3-4 McFarland.
13. En un microtubo agregar 500 µL de esta suspensión y 300 µL de glicerol 50% si cepa estaba almacenada a -20°C y 500 µL si cepa estaba almacenada a -80°C. Sellar

Parafilm y rotular con cinta adhesiva incluyendo código de cepa, fecha e iniciales de quien preparó la suspensión.

14. Almacenar en la caja Cryo King® correspondiente a la cepa según registros.

OBTENCIÓN CEPA DE TRABAJO

1. Para realizar cepas de trabajo puede ser utilizada la suspensión almacenada en paso 9 y sembrar en medio sólido correspondiente e incubar según microorganismo.
2. Una vez obtenido el crecimiento esperado, esta placa debe ser sellada con papel Parafilm y almacenada a 4°C por hasta 3 semanas para su uso.

Nota: cepas de trabajo siembre deben ser preparadas a partir de cepas almacenadas a -20°C, nunca de aquellas almacenadas a -80°C.

11.2 ANEXO 2: DOCUMENTO ALMACENAMIENTO DE CEPAS

Información cepa de trabajo	
Código	
Bacteria	
Cepa	
Plásmido	
Construcción	
Resistencias	
Condiciones de crecimiento	
Encargado de almacenamiento	
Información de almacenamiento	
Código caja criogénica	
Lugar de almacenamiento	
Temperatura	
Medio de suspensión	
Proceso de almacenamiento	
Encargado de Proceso de almacenamiento	
Última resiembra	
Fecha	Encargado de resiembra