

Propuestas de métodos de preservación para *Staphylococcus aureus*

Proposals for preservation methods for *Staphylococcus aureus*

Allelen Campaña Burguet ^{a1}

^a Universidad de Logroño. La Rioja. España.

Recibido: 24 de abril de 2021;

Aceptado: 12 de mayo de 2021;

RESUMEN

En la actualidad se tiene especial interés en descubrir nuevas especies bacterianas, por lo que se hace necesario contar con métodos de preservación de microorganismos que permitan estudios futuros y preservar en las bacterias sus características fenotípicas, genotípicas y una alta viabilidad, así como asegurar el mantenimiento del gran potencial biotecnológico que las bacterias resguardan en sus genomas. Los métodos varían debido a que no existe un preservador único para cada bacteria y deberá identificarse el mejor para cada una, esto da lugar al objetivo del presente trabajo que consiste en proponer métodos de preservación a largo, mediano y corto plazo para *Staphylococcus aureus*. Se realizó la sistematización y análisis documental del tema para realizar la propuesta de los métodos, la que se sometió a consulta de especialistas para la valoración de la viabilidad de los métodos propuestos y se aplicó la prueba no paramétrica Chi-cuadrada de bondad de ajuste (moda) para conocer el nivel de significatividad de la opinión de los especialistas. La sistematización, el análisis documental y la consulta a especialistas permitirá la posterior aplicación de los métodos propuestos y evaluación constante de los cultivos de este microorganismo para comprobar los criterios de pureza, autenticidad y estabilidad, lo que reafirmará la validez de los métodos propuestos. Las sugerencias de mejoras por parte de los especialistas fueron tenidas en cuenta para la propuesta final de los métodos de preservación del microorganismo en estudio.

Palabras claves: consulta de especialista, preservación, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

At present there is a special interest in discovering new bacterial species, it is necessary to have adequate bacterial preservation methods that allow future studies and preserve their phenotypic and genotypic characteristics and high viability in bacteria, as well as ensure the maintenance of the great biotechnological potential that bacteria protect in their genomes, preservation methods vary because there is no single preservative for the conservation of any type of bacteria and the best one must be identified for each one, this gives rise to the objective of this work to propose long, medium and short term preservation methods for *Staphylococcus aureus*. A bibliographic review of the scientific literature on the subject was carried out, the proposal made was submitted to specialists for validation, the non-parametric Chi-square test of goodness of fit (mode) was applied to know the level significance of the opinion of the specialists. The systematization, the documentary analysis for the preservation proposal and the consultation of specialists to assess the viability of the proposed method will allow its subsequent application and constant evaluation of the cultures of this microorganism to assess whether they meet the purity criteria. authenticity and stability, which will reaffirm the validity of the proposed method. The suggestions for improvements by the specialists were taken into account for the final proposal of the preservation methods of the microorganism under study.

Keywords: specialist consultation, preservation; *Staphylococcus aureus*.

¹ 0000-0002-8191-5346

INTRODUCCION

Antonie van Leeuwenhoek hace trescientos años observó por primera vez en un microscopio primitivo unos “pequeños animáculos” que ahora se conocen como microorganismos. Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre (Bagatolli, 2017); (Acosta, 2019).

En la actualidad las bacterias sostienen la vida de nuestro planeta, se conoce alrededor del 1% de su diversidad, muchas de ellas pueden resultar benéficas para ser utilizadas con fines agrícolas, biomédicos y de biorremediación. El empleo de microorganismos para la investigación o la producción no es posible sin el suministro de cultivos viables, auténticos y seguros (Sosa, *et al.* 2017).

Hasta la fecha se han descrito diversos métodos de preservación también conocidos como conservación. Los métodos de preservación varían y debe elegirse un método para los microorganismos que se conservarán con fin de preservar las características de estos (Acosta, 2019). Un preservador único no existe para la preservación de cualquier tipo de bacterias se deben desarrollar protocolos de investigación que permitan seleccionar el método óptimo para cada cepa, el tiempo de conservación y el número máximo de subcultivos que garantizan la estabilidad de los microorganismos (Sosa, *et al.* 2017); (Acosta, 2019).

La preservación de microorganismos sirve en muchos campos de investigación y la consistencia genética es crucial para las bacterias utilizadas (Hernández, *et al.* 2019), por eso existen varios métodos de preservación, a largo, mediano y corto plazo.

Los métodos de elección o a largo plazo son los mejores, se garantiza al máximo la estabilidad genética por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Los métodos que pertenecen a este grupo son liofilización y congelación o criopreservación (Lu, *et al.* 2017); (Boge, *et al.* 2018); (Hernández, *et al.* 2019). Yurani, *et al.* (2019), hicieron referencia al secado por atomización, es un método eficaz sobre todo para bacterias ácido lácticas que permite obtener productos a bajo costo, con relación al secado por liofilización. Es un proceso continuo que consiste en la pulverización de una alimentación fluida en gotas finas (10-150 μm) dentro de una cámara de secado, las cuales entran en contacto con aire caliente (120-200 $^{\circ}\text{C}$) lo que provoca la evaporación rápida del agua y la conservación por largos periodos de tiempos.

Existen métodos alternativos (mediano plazo) se logran mantener la viabilidad de los cultivos entre dos y cinco años, entre estos métodos se pueden citar la desecación en diferentes soportes (arena, sílica gel, perlas de vidrio) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible, así como el almacenamiento en tierra, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), o solución salina. Los métodos de preservación a corto plazo son los subcultivos periódicos a medios frescos proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, que involucran el mantenimiento de cultivos hasta un año (Acosta, 2019).

Las potencialidades de los microorganismos son explotadas en diversos sectores entre los que se encuentran la industria biofarmacéutica y la salud, de ahí la importancia de contar con colecciones bien conservadas que cumplan las premisas de un buen proceso de preservación y garantizar su disponibilidad. La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC, por sus siglas en inglés) es la organización que representa las colecciones de cultivo y traza los lineamientos para su establecimiento y organización (Concepción, *et al.* 2017); (Sosa, *et al.* 2017).

La manipulación y preservación de *Staphylococcus aureus* en el sector de la salud es primordial, esta cepa es el agente etiológico de gran número de infecciones en el hombre. Las infecciones nosocomiales en la actualidad son unos de los principales problemas sanitarios, teniendo particular importancia las infecciones causadas por bacterias multirresistentes dentro de la que se encuentra por su frecuencia y por las dificultades terapéuticas *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) (Araya *et al*,2019); (Hincapié *et al*. 2020). Todas las muestras, las extensiones, así como la siembra de esta cepa se realizarán en cabina de bioseguridad (García, *et al*. 2017).

En la industria biofarmacéutica necesita disponer de cepas de referencia procedentes de subcultivos de cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) u otro cualquier centro certificado para dar este servicio, *Staphylococcus aureus* es una de las cepas usadas en esquemas de certificaciones de la calidad microbiológica (Acosta, 2019). Por lo que se debe contar con métodos de preservación que garanticen la estabilidad de esta cepa una vez que se deposite en la colección de cultivos en los laboratorios de control microbiológico de este tipo de industria (Sosa, *et al*. 2017).

Surge así, el objetivo del presente trabajo proponer métodos de preservación a largo, mediano y corto plazo para *Staphylococcus aureus*

Metodología

Selección de la cepa en estudio

Dentro de las cepas de referencias se encuentran, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, esta última se seleccionó de forma aleatoria para ser usada en el presente trabajo

Propuestas de procedimientos de preservación

Para la selección del procedimiento de preservación de *Staphylococcus aureus* propuesto, se emplearon los métodos teóricos análisis documental y la sistematización.

Se propuso como método a largo plazo la liofilización, mediano plazo se realizaron dos propuestas desecación en perlas de vidrio y almacenamiento en aceite mineral estéril, y a corto plazo subcultivos periódicos a medios frescos (Acosta, 2019).

A continuación, se realizan las propuestas de los esquemas de trabajo a seguir.

Largo plazo

Liofilización

Depositar 20 µL de la suspensión de microorganismo a liofilizar en una placa de Triptona Soya Agar (TSA), diseminar en forma de césped e incubar de 18 a 24 h a ($35 \pm 2^\circ\text{C}$), transcurrido el periodo de incubación colectar un cuarto del crecimiento del cultivo con un hisopo estéril, e inocular en un erlenmeyers que contenga 100 mL de medio Caldo Triptona Soya (CTS), colocar en zaranda a 37°C y 170 r/min durante 2 h. Las células se recolectan por centrifugación a 4°C durante 30 min a 10 000 r/min. La biomasa obtenida se resuspende en 50mL de leche descremada al 20% (sustancia lioprotectora), y se agita hasta su completa homogenización. Tomar 100 µL de la suspensión para determinar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) antes de la liofilización. Distribuir 1 mL en bulbos estériles y colocar el tapón sobre la boca de los bulbos y estos sobre la bandeja de la liofilizadora (Burguet *et al*,2012).

Para comprobar la pureza, tomar 0,1mL de la suspensión bacteriana e inocular en una placa de (TSA), la cual se incubaba a ($35\pm 2^\circ\text{C}$) de 18 a 24 h. Se observarán las colonias crecidas para comprobar las características macroscópicas descritas de este microorganismo y se

comprobará su carácter tintorial mediante tinción de Gram. Se definen las condiciones de liofilización (temperaturas de congelación, condensación y secado, así como presión de trabajo en la cámara entre otros parámetros). Una vez concluido el proceso, los bulbos se sellan al vacío e identifican con una etiqueta con los datos siguientes: género y especie, fecha de liofilización. Una vez identificados de manera correcta se almacenarán entre 2 y 8°C para garantizar su estabilidad a largo plazo. (Burguet *et al*,2012).

Mediano plazo

Almacenamiento en aceite mineral estéril

El aislamiento bacteriano de la cepa *Staphylococcus aureus* se cultiva en Caldo Triptona Soya (CTS), se incuba durante 18 a 24h a 35 ±2°C (temperatura adecuada para este microorganismo). El cultivo se inocula en un erlenmeyer con 100 mL del mismo medio, el cual se incuba a la misma temperatura en zaranda orbital termostataada, hasta alcanzar la fase media logarítmica (METRIXLaboratorios, (2017).

La pureza del cultivo se comprueba mediante tinción de Gram, una vez confirmada la pureza se centrifuga a 10000 rpm por 30 min. La biomasa se resuspende con 100mL de CTS y se toma 0,1 mL de suspensión para recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) para comprobar viabilidad.

El resto de la suspensión se siembra en cuñas de Triptona Soya Agar (TSA) en plano inclinado y se cubre con aceite mineral estéril. Se coloca de 2-8 °C (Castro,2021).

Desecación en perlas de vidrio

Se realizan los pasos descritos en el método de preservación en aceite mineral estéril hasta la resuspensión de la biomasa en 100mL de Caldo Triptona Soya (CTS). Esta suspensión se inocula en viales que contienen perlas de vidrios estériles y medio de cultivo CTS se agita para que las bacterias se adhieran a las perlas. Luego de 30 minutos se remueve el medio de cultivo con una micropipeta y se seca al vacío evitando la congelación. Una vez secos es importante mantener el producto sellado (viales) para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicos (Bagatolli, 2017).

Corto plazo

Subcultivos periódicos a medios frescos

El aislamiento bacteriano de la cepa *Staphylococcus aureus* se cultiva en Caldo Triptona Soya (CTS), se incuba durante 18 a 24h a la temperatura (35 ±2°C). Se realizan resiembras del microorganismo en medio fresco cada cierto tiempo (semana - 15 días) en cuñas inclinadas de Triptona Soya Agar (TSA). Estos cultivos se mantienen a temperatura ambiente.

En todos los casos se efectuarán controles de calidad para comprobar pureza, viabilidad y características bioquímicas con el objetivo de demostrar que los microorganismos permanecen genéticamente estables, estos controles se realizan en el tiempo para evidenciar la efectividad de los métodos de preservación propuestos a largo, mediano plazo y corto plazo (Acosta, 2019).

Pureza

Transferir el contenido a un tubo con 20 mL de Caldo Triptona Soya (CTS). Los tubos se colocan en zaranda con agitación durante 2 h a una temperatura de 35 ± 2°C. Transcurrido ese tiempo, se toma 0,1mL de la suspensión bacteriana y se inocula en una placa de Triptona Soya Agar (TSA), la cual se procederá a incubar a (35±2°C) por 24 h. Se observan las colonias crecidas en el medio de cultivo para comprobar las características macroscópicas

descritas de este microorganismo y se comprueban las características microscópicas a través de su carácter tintorial mediante tinción de Gram (Burguet *et al*,2012).

Viabilidad

Se realiza el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^{-8} , las diluciones se siembran en la superficie de placas que contienen medio de cultivo Triptona Soya Agar (TSA). Cada dilución se siembra por triplicado. Se considera satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL, valor establecido en las especificaciones de calidad propuestas por Burguet *et al*, (2012).

Comprobación de las características bioquímicas

Se realiza a través de una batería bioquímica descritas para este microorganismo o usando pruebas de diagnóstico e identificación rápidas que se comercializan en el mercado.

Burguet y Campaña (2020), recomiendan cumplir con las medidas de bioseguridad para manipular la cepa cuando se vaya a emplear cualquiera de estos métodos, para lo cual el personal que labora en el mantenimiento y preservación de microorganismos deben estar capacitados en esta temática (Sebasco y Nápoles, 2018); (Cobos, 2021).

Consulta a especialistas

Se realizó la consulta a un grupo de 10 especialistas, para valorar por parte de ellos la viabilidad del método de preservación propuesto para la cepa de *Staphylococcus aureus*. Los especialistas fueron consultados con anterioridad para conocer su disposición en participar, a partir de comunicarle que por su experiencia en esta área y los años de trabajo con la preservación de microorganismo son considerados especialistas en la temática que se trata.

Así, el grupo de especialista quedó conformado por graduados de microbiología que trabajan en la actualidad o han trabajado en el mantenimiento y preservación de cepas. Estos especialistas tienen entre 10 y 40 años de experiencias en el área de la microbiología.

Estadística descriptiva e inferencial

Se empleó de la estadística descriptiva (Che y Pérez,2006), la moda para evaluar la tendencia del comportamiento de las opiniones de los especialistas respecto método de preservación propuesto para la cepa de *Staphylococcus aureus*.

La estadística inferencial (Che y Pérez,2006), para el análisis de significatividad en la opinión de los especialistas a favor de la viabilidad de la propuesta de preservación.

Se define una escala valorativa nominal, con tres subclases mutuamente excluyentes (viable la propuesta de preservación, no viable la propuesta de preservación y modificar la propuesta de preservación).

Teniendo en cuenta la escala valorativa, se selecciona como prueba no paramétrica Chi Cuadrado de bondad de ajuste, en este caso con dos grados de libertad.

Se formulan como hipótesis alternativa(H_1): Hay diferencia significativa en la opinión de los especialistas a favor de la viabilidad respecto método de preservación propuesto para la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Como Hipótesis nula (H_0): No hay diferencia significativa en la opinión de los especialistas a favor de la viabilidad respecto método de preservación propuesto para la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Se fija como niveles de significación a $\alpha = 0,05$ (95% de confiabilidad) y $\alpha = 0,01$ (99% de confiabilidad), con $X^2_{TEÓRICA} = 5,9914$ y $X^2_{TEÓRICA} = 9,2103$ respectivamente.

Se utiliza como regla de decisión que para todo para todo valor de probabilidad $\alpha \leq 0,05$, se acepta H_0 .

Resultados y Discusión

La sistematización y el análisis documental realizado sobre la preservación de *Staphylococcus aureus*, permitió proponer el método de liofilización para la preservación de esta cepa a largo plazo, la cual consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío (Acosta,2019). Los métodos de preservación a largo plazo son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no mueren. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Los liofilos se conservan entre 0 y 5°C durante muchos años. Para su recuperación se resuspende el liofilo en el medio de cultivo adecuado y se incuban a la temperatura especificada para este microorganismo (Burguet *et al*,2012).

En el caso de la preservación a mediano plazo las propuestas (almacenamiento en aceite mineral estéril y desecación en perlas de vidrio), son métodos utilizados con frecuencia para la preservación de bacterias (Bagatolli, 2017). En el caso de las perlas de vidrio este método reduce de manera drástica el metabolismo de las células del microorganismo, presenta la ventaja que para su estudio es suficiente con una perla que se siembra en medio líquido o sólido y no es necesario descongelar todo el vial (Castro,2021).

El subcultivo periódico a medio fresco también se conoce como resiembra periódica, es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de preservación a corto plazo. Se basa en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, lo que condiciona el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas (mutación con cada transferencia), así como riesgo de contaminación y alteraciones en el medio de cultivo, durante la etapa en frío, que produce una desecación gradual del mismo las cuales constituyen las principales desventajas del método (Acosta,2019).

Los métodos para la conservación de microorganismos propuestos en este trabajo son de suma importancia en el sector biofarmacéutico y organizaciones que contemplen en su objeto social el empleo de los microorganismos, esto responde a que en la actualidad se ha visto un incremento en la apreciación del valor de las colecciones de cultivos de microorganismos, tanto para la conservación de recursos genéticos y la biodiversidad, como para proveer la fuente esencial para el desarrollo de la industria biofarmacéutica. Por estas razones, es importante disponer de cepas patrones útiles en el aseguramiento de la calidad de múltiples procesos industriales, evaluación de materias primas, productos y tecnologías (Acosta,2019).

La manipulación de cepas microbianas requiere de medidas de bioseguridad cuando se va hacer uso de cualquiera de los métodos de preservación propuesto en este trabajo, por lo que se debe incluir aspectos que permitan el cumplimiento de las regulaciones nacionales de bioseguridad, así como la clasificación de los desechos y su naturaleza generados por cualquier actividad en la preservación de las cepas que por sus características físicas, biológicas o químicas puedan representar un peligro para el medio ambiente y la salud humana (Sebasco y Nápoles, 2018); (Cobos, 2021).

Consulta a especialistas

Al evaluar los resultados obtenidos de la consulta a especialistas mostró que los 10 profesionales que valoraron el método de preservación propuesto cuentan con reconocido prestigio en su área y tienen un marcado desempeño profesional en lo relacionado con la preservación de microorganismos. Estos especialistas llevan entre diez y cuarenta años de

experiencia en el trabajo con microorganismos, en el grupo dos cuentan con categoría de Doctor en Ciencias, 3 son Master y el resto Licenciados en Microbiología. En su mayoría trabajan en la industria biofarmacéutica (8), en microbiología clínica 1 y profesor en la Universidad de Ciencias Médicas 1.

De los 10 especialistas 8 que representa un 80% consideran la propuesta de preservación para *Staphylococcus aureus* como viable. El 20% (2 especialistas) están de acuerdo con los métodos propuestos, pero proponen realizar modificaciones según sus experiencias en la preservación de este microorganismo.

El primer especialista realiza dos sugerencias, la primera dirigida al método de preservación a mediano plazo de manera específica a la Desecación en perlas de vidrio, sugirió añadir al medio de cultivo leche descremada o glicerol al 10% como agente protector. La segunda sugerencia se refería a la preservación a corto plazo Subcultivo periódico a medio fresco la propuesta consiste en colocar las cuñas a 4°C y hacer subcultivos a 1 - 3 meses, con el objetivo de prevenir contaminación y variabilidad de las características de las cepas.

El otro especialista realiza tres comentarios o sugerencias según sus vivencias en esta área por 40 años. Las dos primeras están referidas al método a largo plazo Liofilización, la primera de manera específica a la sustancia lioprotectora propuesta (leche descremada al 20%), según su experiencia en la preservación de esta cepa, sugiere se utilice el glicerol 10 %, plantea que es un crioprotector no iónico, que reduce la cantidad de hielo que se produce durante la etapa de congelación a bajas temperaturas y que debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja siendo mucho menor el daño que se produce en las células.

El segundo comentario está relacionado en el hecho de que para emplear la liofilización se debe contar con equipamiento y personal entrenado en este tema, por lo que propone usar la Congelación a -70°C que también es un método de elección a largo plazo que ha usado para la preservación de esta cepa con muy buenos resultados.

El tercer comentario es una propuesta de otra variante para realizar el ensayo de viabilidad que se muestra a continuación:

Ensayo de viabilidad

Por el método de minicuento dividir una placa de TSA en 4 partes iguales, hacer diluciones seriadas (100µL de cultivo + 900 µL de CTS) así de manera sucesiva hasta 10⁸ UFC/mL, sembrar por triplicado 10 µL de las diluciones 10⁸ hasta 10⁴ incubar 18-24 h, una vez transcurrido el tiempo de incubación proceder a contar las colonias crecidas. Se considerará satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10⁵UFC/mL

Todas las sugerencias realizadas por los especialistas se tendrán en cuenta cuando se vaya a ejecutar los métodos de preservación para esta cepa. En cuanto a incluir dentro de los métodos a largo plazo la Congelación a -70°C, a la autora le pareció muy aceptada la sugerencia y propone la siguiente metodología.

Procedimiento

La propuesta se basa en sembrar en placa de Triptona Soya Agar (TSA) el microorganismo, incubar de 18-24 horas a 35 ± 2°C, una vez concluido el periodo de incubación proceder a recoger un 1/4 del cultivo en 3mL de Caldo Tripotona Soya (CTS) y añadir este a un elermeyer que contiene 100mL de CTS, se incuba en zaranda termostataada a 200rpm durante 2-4 horas hasta que el cultivo alcance una DO≥1.0 .Se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 40 mL de solución de medio fresco y glicerol al 20 %.Se procede a determinar pureza por tinción de Gram.

Una vez confirmada la pureza se distribuye 1 mL de cultivo con crioprotector en crioviales, se congelarán de manera gradual y se almacenarán en congelador entre -70°C. Se tomaron muestras para determinación de la concentración de células viables de los cultivos conservados a las 24 horas de almacenado (Sosa, *et al.* 2017).

Estadística descriptiva e inferencial

Los resultados de la aplicación de la estadística descriptiva e inferencial mostraron que la tendencia de las opiniones de los especialistas, según la moda como medida de tendencia central, prevalece el criterio de viabilidad de los métodos de preservación propuestos. En la tabla 1 se muestra el procedimiento para el valor de chi-cuadrado calculado.

Tabla 1. Cálculo del valor de chi-cuadrado

Frecuencias	Viable propuesta preservación	la No viable de propuesta preservación	la de	Modificación de la propuesta de preservación
Frecuencia observada (Fo)	8	0	2	
Frecuencia esperada (Fe)	33,3	33,3	33,3	
Fórmula	$X^2_{\text{CALCULADO}} = \frac{(F_{o1} - F_e)^2}{F_e} + \frac{(F_{o2} - F_e)^2}{F_e} + \frac{(F_{o3} - F_e)^2}{F_e}$			
Resultado	$X^2_{\text{CALCULADO}} = \frac{(8 - 33,3)^2}{33,3} + \frac{(0 - 33,3)^2}{33,3} + \frac{(2 - 33,3)^2}{33,3}$ $= 84,64$			

El valor de $X^2_{\text{CALCULADO}} \geq X^2_{\text{TEÓRICO}}$, entonces se puede rechazar la hipótesis nula y afirmar con un nivel de confiabilidad del 99%, que es significativa la opinión de los especialistas a favor de la viabilidad de los métodos de preservación propuestos.

CONCLUSIONES

Las sugerencias de mejoras por parte de los especialistas fueron tenidas en cuenta para la propuesta final de los métodos de preservación de la cepa *Staphylococcus aureus*, por lo que al finalizar el trabajo se dispone de dos propuestas para la preservación a largo plazo (Liofilización y Congelación a -70°C), dos a mediano plazo Almacenamiento en aceite mineral estéril y Dsecación en perlas de vidrio y Subcultivos periódicos a medio fresco para la preservación a corto plazo, guardadas a temperatura ambiente y a 4°C.

RECOMENDACIONES

Realizar la constatación práctica de los métodos de preservación propuestos para *Staphylococcus aureus*, con el fin de evaluar en cada método la viabilidad, pureza y estabilidad genética de esta cepa

Valorar la posibilidad de hacer extensivo el estudio de estos métodos de preservación a otras cepas de microorganismos de referencias, que se utilizan en ensayos de calidad microbiológicos en la industria biofarmacéutica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, AK. (2019). *Evaluación de técnicas de preservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*. Trabajo de Grado para obtener el título de Microbióloga Industrial. Bucaramanga, Colombia. Recuperado de <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/3756/3/Universidad/Santander.pdf>
- ARAYA, S., GALEANO, F., AMARILLA, S., GONZÁLEZ, N. Y COL. (2019) Factores pronósticos de gravedad de las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad en niños. *Arch Argent Pediatr* 117(6):381-387 Recuperado de <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1046258?src=similardocs>
- BAGATOLLI, CD. (2017). *Validación de un método alternativo para la preservación de bacterias*. Tesis de Grado para optar por Licenciatura en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza – Argentina. Recuperado de <http://www.fca.uncu.edu.ar/>
- BOGE, L., VÄSTBER, A., UMERSKA, A., BYSELL, H., ERIKSSON, J., EDWARDS, K., et al. (2018). Freeze-dried and re-hydrated liquid crystalline nanoparticles stabilized with disaccharides for drugdelivery of the plectasin derivative AP114 antimicrobial peptide. *J Colloid Interface Sci.* 522:126–135. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.03.062>
- BURGUET, N., CAMPAÑA, A. (2020). Propuesta de una estrategia de capacitación en bioseguridad en la Unidad Empresarial de Base Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 51(3), 207-221. Recuperado de <https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevBiol/article/view/459>
- BURGUET, N., SIERRA, N., BRITO, L. (2012). Preservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* 43 (3): 151-154 Recuperado de <https://es.scribd.com/document/352374135>
- CASTRO, HI. (2021). *Ingeniera Bioquímica*. Recuperado de https://www.academia.edu/21079007/Ingeniera_Bioquimica/ADmica
- CHE, J., PÉREZ, O.A (2006). *Consideraciones sobre la Estadística aplicada a las investigaciones pedagógicas*, (Soporte digital), Material Básico del Curso de Estadística para la Maestría Matemática y su Didáctica, (IPLAC), República de Panamá. Pp 86
- COBOS, D. (2021). Bioseguridad en el contexto actual. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.* 58: e192 Recuperado de <http://rev Epidemiologia.sld.cu/index.php/hie/issue/view/76>
- CONCEPCIÓN, A., GUTIÉRREZ, J., GUADALUPE, R., HIPPERDINGER, M., FALVO, M., CELESTE D’ALESSANDRO, C., et al. (2017). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 49(2):183-188 Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-organizacion-conservacion-coleccion-hongos-patogenos-S0325754116300943>
- GARCÍA, M., GONZÁLEZ, J.J., ORTA, N., SÁNCHEZ, M. I. (2017). *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. DOCUMENTO CIENTÍFICO ISBN: 978-84-697-4782-7 Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>

- HERNÁNDEZ, D., TORRES, N., CROSBY, M., HERRERA, J. (2019). Uso de disacáridos y carbón activado para preservar consorcios de bacterias ruminales celulolíticas liofilizadas. *Revista MVZ* 24(3): 7305-7313 Septiembre-Diciembre Córdoba Recuperado de <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/article/view/1412>
- HINCAPIÉ, C., GALEANO, J. A., TIBADUIZA, M. F., RESTREPO, C., GARCÉS, D., CARABALLO, C., et al. (2020). Mortalidad por estafilococcemia: influencia de la resistencia a meticilina y lugar de adquisición de la infección, en una cohorte de pacientes de Medellín, Colombia. *ENF INF MICROBIOL* 40 (1): 8-15 Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2020/ei201b.pdf>
- LU, Y., HUANG, L., YANG, T., LV, F., LU, Z. (2017). Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. *Food Sci Technol.* 80:92-97. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.044>
- METRIXLaboratorios. (2017). *Preservación de Microorganismos*. Recuperado de <https://www.metrixlab.mx/preservacion-de-microorganismos/>
- SEBASCO, R.K., NÁPOLES, V.D. (2018). La seguridad biológica en el laboratorio de anatomía de la Facultad de Ciencias Médicas “comandante Manuel Fajardo”. *Cuba y Salud* 13(2):48-53 Recuperado de <https://www.medigraphic.com>
- SOSA, A., GONZÁLEZ, N., GARCÍA, Y., MARRERO, Y., VALIÑO, E., GALINDO, J., et al. (2017). Colección de microorganismos con potencialidades como aditivos para la nutrición animal del Instituto de Ciencia Animal. *Cuban J. Agric. Sci.* 51(3) Mayabeque jul.-set. Versión impresa ISSN 0864-0408 Versión On-line ISSN 2079-3480 Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802017000300004
- YURANI, M., CORTÉS, M., VALENCIA, F.E. (2019). Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión. *Ingeniería y Ciencia* 15(29):179–213 ISSN:1794-9165 ISSN-e: 2256-4314 Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v15n29/1794-9165-ince-15-29-179.pdf>