



PROTOCOLO CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

CÓDIGO: DGIA/BG/P-02.01/CCB

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por



DISTRIBUIDO A:

DEC	DGIA	AFIA	
-----	------	------	--



Copia No:
ÉSTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 2 de 8

1. OBJETIVO:

El presente protocolo establece las pautas a seguir para realizar la crioconservación de cepas bacterianas.

2. ALCANCE:

Se aplica al proceso de crioconservación de cepas bacterianas de muestras de agua de mar y de diversas patologías de organismos acuáticos.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

- **Crioconservación:** proceso que permite la conservación de las células a bajas temperaturas, en el presente caso las cepas bacterianas son sometidas a congelación a temperaturas que oscilan generalmente entre -20 y -80 °C, por espacio de doce meses.
- **Reactivación:** Es el proceso que consiste en el paso del estado de latencia del material biológico sometido a crioconservación a la recuperación normal de su viabilidad, funcionamiento de las rutas metabólicas y crecimiento.

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1. Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2. Supervisa las actividades que involucran la crioconservación.
- 4.3. Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.4. Gestiona y verifica cumplimiento de plan de mantenimiento y calibración de equipos.
- 4.5. Designa y autoriza al personal capacitado para realizar la crioconservación.

El Analista:

- 4.6. Aplica el presente protocolo, para la ejecución de la crioconservación de las muestras que lo solicitan.
- 4.7. Realiza la verificación de la información sobre la cepa a crioconservar.



Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick,
Bach. Carla Fernández Espinel
Fecha: Junio 2016

Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Julio 2016

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Directora de la DGIA
Fecha: Agosto 2016

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 3 de 8

4.8. Registra información en formato correspondiente.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

5.1. EQUIPOS

- Centrifuga refrigerada.
- Autoclave.
- Balanza analítica y/o electrónica.
- Congelador -20°C.
- Cámara de flujo laminar.

5.2. MATERIALES

- Crioviales estériles.
- Matraz de 200 ml de capacidad.
- Micropipeta de 100-1000µl.
- Guantes quirúrgicos estériles descartables.
- Tips estériles de 100-1000 µl.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Asa de siembra calibrada estéril de 10 µl.

5.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Cerebro Corazón (BHI).
- Solución estéril de Glicerol al 10%.
- Agar Trypticase de Soya (TSA).
- Agar Glutamato Rojo Fenol y Almidón (GSP).
- Agar Tiosulfato Citrato de Sales Biliares Sacarosa (TCBS).
- Agar Mac Conkey.

5.4. CEPAS BACTERIANAS

- *Vibrio alginolyticus*.
- *Aeromonas hydrophila*.



Elaborado: Biga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 4 de 8

➤ Citrobacter freundii.

6. PROCESO DE CRIOCONSERVACION

6.1. CONSIDERACIONES PREVIAS A LA CRIOPRESERVACIÓN

- a. Almacene los medios de cultivo deshidratados siguiendo las instrucciones del fabricante, en un lugar fresco, seco y protegido de la luz directa.
- b. Descarte los medios que muestren cambios en la coloración o cualquier otro signo de deterioro.
- c. Descarte los frascos con medios vencidos.

6.1.1. PREPARACION DE MEDIOS

- a. Prepare cada medio, según las indicaciones del fabricante.
- b. Mida el pH de una porción del medio de cultivo y compárelo con las indicaciones del fabricante, si la diferencia del pH es de más de 0.5 unidades descartar el lote preparado; si la diferencia es menor, ajustar con una solución de NaOH ó HCl 1N hasta obtener el pH indicado por el fabricante.
- c. Rotule los medios de cultivos preparados indicando el nombre del medio, fecha de preparación, nombre de la persona que preparó y fecha de vencimiento.
- d. Una vez preparado el medio proceda con su esterilización.

6.1.2. ESTERILIZACIÓN

- a. Esterilice los medios de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- b. Retire los medios esterilizados del autoclave tan pronto como la presión llegue a cero. **NUNCA RE-AUTOCLAVE LOS MEDIOS.**
- c. Verifique la esterilización cada vez que se use la autoclave utilizando la cinta indicadora de esterilización en cualquiera de los



Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGI/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 5 de 8

recipientes de los medios a esterilizar. Colocar por los menos una cinta en cada nivel del equipo.

- d. Esterilice programando la autoclave a 121°C durante 15 minutos o según indique las especificaciones del fabricante.
- e. Posterior al autoclavado, poner los medios en control por 18 a 24 horas y posteriormente almacenarlos en refrigeración a 4 a 5°C, o según las indicaciones del fabricante.
- f. Para emplear los medios, a tempere, para el caso de caldos; o licue en baño en baño maría, para el caso de agares.
- g. Anote todos los datos requeridos en el registro interno de trabajo.

6.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- a. Asegúrese de mantener aséptico el ambiente en la siembra, para ello, todos los análisis deben realizarse junto a un mechero o en la cabina de bioseguridad.
- b. Asegúrese que los medios a emplear en este proceso sean estériles, mediante controles.
- c. Siembre por inoculación la cepa bacteriana a procesar en tubos con caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) previamente esterilizado.
- d. Incube a 30°C x 18 horas.
- e. A partir de los tubos inoculados con la cepa bacteriana, tome una asada (emplee un asa calibrada estéril de 10µl, la calibración garantiza el mismo volumen de inóculo) y siembre por estría por agotamiento en los medios selectivos TCBS, GSP y Mac Conkey, respectivamente, con la finalidad de evaluar la pureza de las cepas bacterianas.
- f. Incube entre 18 y 24 horas a la temperatura óptima (temperatura que optimiza el crecimiento bacteriano en la fase exponencial y es diferente para cada especie), tomando como referencia las temperaturas de crecimiento de las cepas ATCC (ver tabla 1)



Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 6 de 8

Tabla 1. Temperatura óptima de crecimiento según cepa bacteriana

Cepa	Temperatura óptima
<i>Vibrio alginolyticus</i>	37 °C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30 °C
<i>Citrobacter freundii</i>	37 °C

- g. Transcurrido el tiempo de incubación, retire las placas petri sembradas y observe la homogeneidad en la morfología de las colonias; de no ser el caso, realizar la purificación mediante resiembras sucesivas en los medios selectivos.
- h. A partir de los medios selectivos, repique las cepas bacterianas por inoculación en caldo BHI a la temperatura óptima (ver tabla 1), por 18 a 24 horas.
- i. Cumplido el tiempo de incubación, siembre por estría por agotamiento en placas Petri conteniendo Agar TSA suplementado con 1% de Cloruro de Sodio e incube a temperatura óptima (ver tabla 1) por 18 a 24 horas, dependiendo de la cepa en estudio.
- j. Transcurrido el tiempo de incubación retire las placas y seleccione colonias para realizar la coloración Gram para su evaluación morfológica que confirme microscópicamente a la cepa aislada.
- k. Una vez confirmada la viabilidad, pureza, identificación microscópica (coloración Gram), proceda a identificar la cepa bacteriana utilizando el sistema de identificación comercial API 20NE o API20E y siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3. PREPARACIÓN DE LA CEPAS A CONGELAR

- a. En tubos de ensayo estériles, prepare suspensiones de las bacterias identificadas, que correspondan aproximadamente a una concentración de 4 Escala Mc Farland (7.5×10^8 UFC/ml).



Elaborado: Biga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGI/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 7 de 8

- b. Adicione 100 µl de la suspensión bacteriana en los crioviales que contengan caldo BHI.
- c. Agregue glicerol al 10% (100 µl por 1 ml de medio) y lleve inmediatamente a congelar a -20°C.

6.4. DESCONGELACIÓN Y REACTIVACIÓN DE CEPAS

- a. Saque los crioviales mantenidos a -20°C y espere a que descongele.
- b. Una vez descongelados los crioviales y empleando un asa calibrada estéril, inocule una asada de cada microorganismo, en tubos con 3 ml de caldo BHI respectivamente.
- c. Incube por 3 horas a temperatura óptima (vea tabla 1) dependiendo del microorganismo en estudio.
- d. Transcurrido el tiempo, siembre por estría por agotamiento en los medios selectivos para evaluar la viabilidad e Incubar a temperatura óptima dependiendo de la cepa.
- e. Realice las lecturas de las siembras a las 24 y 48 horas para observar el crecimiento bacteriano.
- f. Realice el recuento de los microorganismos, para ello siembre las cepas por la técnica de extensión en placa de Petri conteniendo agar TSA e incube a la temperatura óptima por 24 a 48 horas.
- g. Realice el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml). El criterio de conteo es escoger placas que muestren entre 30 y 300 colonias.
- h. Para el cálculo de las UFC/mL, de cada placa Petri, contabilice el número de colonias y multiplique por el factor de dilución, como se indica en la siguiente formula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{Factor de dilución}) * \text{número de colonias}}{\text{mL de la muestra sembrada**}}$$



Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGI/BG/P-02.01/CCB
	CRIOCONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12/07/2016 Página 8 de 8

Donde:

UFC: Unidades formadoras de colonias.

*Factor de dilución: 100 ml.

**volumen del asa calibrada: 0.01ml.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

SÁNCHEZ, L., CORRALES, L. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. NOVA, Vol.3, 21-2.

PÉREZ, D., SOSA, A. 2010. Evaluación de la tolerancia a la criopreservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología. Vaccimonitor, Vol. 19 No. 2.

VARA A. E. & PABLO E. GIL-LOYZAGA. 2011. Criopreservación de células y tejidos. Universidad Complutense de Madrid. Ed. Visión Libros. [Internet] [Consultado 18 de julio del 2016]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=nQ9ZBQAAQBAJ&pg=PA103&dq=criopreservaci%C3%B3n&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjxv8ma8_3NAhWKGx4KHQsMBLcQ6AEIMDAE#v=onepage&q&f=false



Elaborado: Blga. Violeta Flores Dominick, Bach. Carla Fernández Espinel Fecha: Junio 2016	Revisado: M.Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera santos Directora de la DGIA Fecha: Agosto 2016
--	---	---