

Protocolo de manejo de la Colección de Microorganismos de la Universidad EAFIT

Según lo establecido en el Decreto 1375 de 2013 artículo

1. Política de la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT

1.1. Misión

Descripción de la colección: Colección de microorganismos de la Universidad EAFIT.

Nuestra colección de microorganismos busca albergar nuevos microorganismos de bacterias, levaduras y hongos obtenidos de diferentes ambientes. Los microorganismos son los organismos más numerosos y diversos del universo los cuales juegan un papel muy importante en el equilibrio de los ecosistemas. Los microorganismos son organismos unicelulares pequeños que solo pueden visualizarse al microscopio. Se pueden clasificar como bacterias, arqueas, eucariotes. Los virus también son clasificados como microorganismos, pero requieren de un hospedero para su reproducción.

El objetivo de la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT es conservar en condiciones óptimas las cepas microbianas aisladas del territorio nacional con el fin de acceder a su información molecular y bioquímica con fines científicos no comerciales. Adicionalmente se tiene por objetivo fortalecer el Inventario Nacional de la Biodiversidad y difundir el conocimiento científico acerca de la riqueza de microorganismos y su potencial e importancia en los ecosistemas colombianos.

El énfasis de la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT está inicialmente enfocado a la conservación de bacterias, hongos y levaduras con el fin de investigar su potencial en diferentes áreas de la industria: agrícola, alimentos y química.

1.2. Visión

En concordancia con la visión de la Universidad EAFIT, la colección de microorganismos tiene como visión contribuir al progreso de la Nación mediante la conservación y el acceso de la colección. Específicamente se proyecta ampliar la colección de microorganismos para permitir el desarrollo de investigaciones científicas que fortalezcan el conocimiento sobre la biodiversidad nativa colombiana y su potencial en diferentes ámbitos industriales.

1.3. Estructura organizacional:

La colección de microorganismos de la Universidad EAFIT tendrá la siguiente estructura jerárquica:

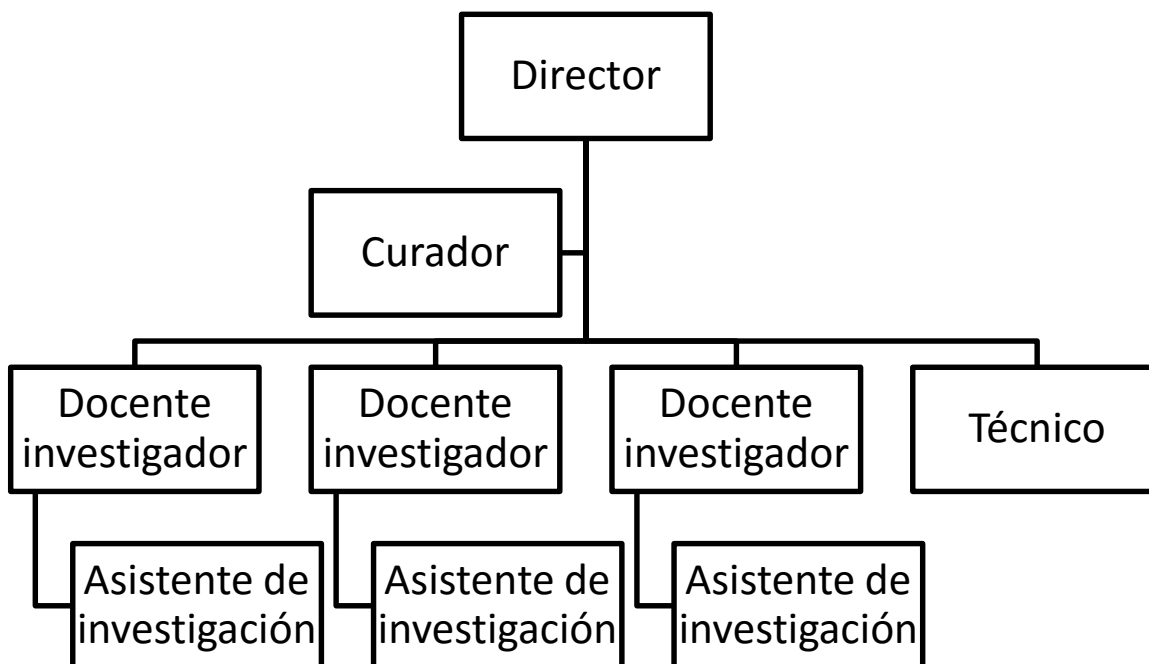
Director de la colección: el director de la colección será nombrado por el representante legal de la Universidad EAFIT, quien velará por el cumplimiento del protocolo de colección y de la implementación y gestión de los formatos de depósito, de consulta, de transferencia de material, entre otros.

Técnico: el técnico del laboratorio velará por el buen funcionamiento de los equipos para la conservación de la colección.

Curador: el Curador brindará apoyo y asesoría a las labores de investigación y velará por la correcta identificación y mantenimiento de los especímenes dentro de la colección.

Docente investigador: cada docente investigador que realice un proyecto de investigación donde se realicen aislamientos o manipulación de microorganismos, es responsable de cumplir con los procedimientos y formatos para la conservación de los mismos. Así mismo, debe informar al director de los nuevos depósitos y avances.

Asistente de investigación: Los asistentes de investigación tienen como responsabilidad realizar el trabajo experimental para mantener la colección viable y pura.



2. Protocolo de conservación preventiva:

Todos los ejemplares de la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT se encuentran principalmente criopreservados a -80°C en freezers ubicados en diferentes laboratorios de la Universidad EAFIT.

El protocolo de monitoreo para determinar el estado de preservación de la colección incluye:

- Ejecutar el plan de mantenimiento preventivo de los freezers según el sistema de gestión de la calidad código F04-MAD4. Este plan incluye: limpiar trimestralmente la toma de aire y el filtro de rejilla, limpiar trimestralmente el sello de la tapa, realizar semestralmente procesos de descongelamiento para la eliminación de escarcha, lubricar anualmente el exterior de la puerta y la manija mecánica, revisar diariamente la temperatura de los freezers.
- Propiciar el equipamiento necesario para la manipulación de cada ejemplar de la colección de tal forma que se garantice esterilidad en el proceso. Los laboratorios cuentan con aire acondicionado, filtros HEPA, cabinas de seguridad, autoclaves, centrífugas, cuartos de cultivo entre otros. Todos los equipos cuentan con un aseguramiento de calidad y tienen definidos la periodicidad de su mantenimiento según el sistema de gestión de la calidad respectivo.
- Realizar restauración y limpieza de cada ejemplar. Según el tipo de microorganismo se realiza mantenimiento de la colección por personal autorizado y experimentado, el cual se especifica en el protocolo de curaduría.

3. Protocolo de curaduría:

Este protocolo describe el procedimiento de mantenimiento y curaduría taxonómica e incluye: depósito, preparación, etiquetado, catalogación y almacenamiento de ejemplares. También incluye los procedimientos y estrategias para la identificación de ejemplares.

3.1. Depósito de ejemplares

La adición y depósito de especímenes de microorganismos a la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT, será realizado única y exclusivamente por personal capacitado en técnicas asépticas en trabajo microbiológico observando los más altos estándares posibles de limpieza y esterilidad de los materiales empleados y la máxima pureza de los cultivos a ser depositados. Para el depósito de un ejemplar será diligenciado el formato de depósito (Anexo 1) y la Plantilla de información asociada a los especímenes (Anexo 2). Cada ejemplar depositado será etiquetado según nomenclatura referida o acrónimo asignado.

3.2. Almacenamiento de ejemplares

El almacenamiento y la preservación de los ejemplares de microorganismos será preferiblemente criogénica, utilizando los criopreservantes y protocolos previamente optimizados para la preservación de la viabilidad de los cultivos en cuestión y consignados en los protocolos institucionales. En casos donde no sea posible la criopreservación por razones biológicas específicas al cultivo en cuestión, se

emplearán métodos alternos previamente demostrados en la preservación de la viabilidad de dicho cultivo. En caso de tratarse de microorganismos sin previo trabajo en la institución, se aplicarán las recomendaciones contenidas en la guía de criopreservación de la American Type Culture Collection (ATCC) escrita por Frank P. Simione, ó por guías de equivalente autoridad debidamente referenciadas.

Para revisar los protocolos de almacenamiento y preservaciones de diferentes grupos microbianos consultar los siguientes anexos:

Anexo 3: Protocolo de almacenamiento de bacterias formadoras de endosporas.

Anexo 4: Protocolo de almacenamiento de hongos filamentosos patógenos de plantas.

Anexo 5: Protocolo de almacenamiento de microalgas.

Anexo 6: Protocolo de almacenamiento de levaduras y mohos.

3.3. Identificación de ejemplares

La identificación de microorganismos, en caso de ser necesaria y posible, será realizada principalmente por análisis fenotípicos y genotípicos. Para cada ejemplar se realizará:

- Análisis fenotípico: determinar rasgos morfológicos y características bioquímicas.
- Análisis genotípico: se fundamenta en el uso de métodos moleculares para analizar secuencias de ADN o RNA. Se empleará la secuenciación del gen 16S rDNA para bacterias y 18S rDNA para hongos y levaduras principalmente.

3.4. Mantenimiento de ejemplares.

Periódicamente según la necesidad de cada tipo de microorganismo se realizará mantenimiento de la colección. Dicho mantenimiento consiste en:

- Realizar un repique de caja ejemplar para determinar su viabilidad y pureza.
- En caso de existir contaminación se purifica el microorganismo original y se almacena apropiadamente para sustituir el ejemplar contaminado.
- En caso de existir baja viabilidad del ejemplar se realiza una activación y una nueva copia del ejemplar para su apropiado almacenamiento, registrándola como un derivado del espécimen silvestre original.
- Se realizará un registro de todo el trabajo de mantenimiento realizado.

4. Protocolo para el depósito de material en la colección biológica

- Para el depósito de un nuevo ejemplar en la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT el depositante deberá diligenciar el formato de constancia de depósito (Anexo 1). Para poder depositar el ejemplar, el depositante deberá anexar los siguientes documentos:
 - Permiso de Recolección de Especímenes Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, o Permiso de Recolección de Especímenes de

la Diversidad Biológica para elaboración de Estudios de Impacto Ambiental-EIA así como otra documentación que acredite su procedencia legal.

- Archivo digital con la plantilla diligenciada de la información asociada a los especímenes (ejemplar o lote) depositados.

(El archivo se encuentra disponible en el siguiente link: www.sibcolombia.net/web/sib/cr-sib - En la parte inferior del documento, ingresar a la opción 2 (descargue la planilla de registros biológicos y el instructivo.)

- En el caso de ejemplares tipo, copia de la publicación científica de la descripción.
- En caso de que se rechace la aceptación del material, el director de la colección proveerá a la persona interesada una carta indicando la razón por la cual se reserva el derecho de recibir los especímenes (Decreto 1076 de 2015, Capítulo 9, Artículo 2.2.2.9.1.8.1). De cualquier forma, la Universidad se reservará el derecho de aceptar el depósito de microorganismos.

5. Protocolo de uso de material

La colección de microorganismos de la Universidad EAFIT no está disponible para acceder libremente por las condiciones de bioseguridad y los requisitos legales requeridos. En caso de requerir un ejemplar mediante transferencia, préstamo y canje, consulta de especialistas y/o público en general, se deberá seguir el siguiente procedimiento.

5.1. Consulta

- Diligenciar el Formato de Consulta (Anexo 7) y enviarla vía correo electrónico al director de la colección.
- El director de la colección dará respuesta a la solicitud en un término de 15 días hábiles. Si se otorga la autorización, y previa a la suscripción de los documentos legales aplicables, el director de la colección programará la fecha de la consulta.
- El día de la consulta, el interesado estará acompañado de personal calificado y autorizado para mostrar la colección y responder preguntas e inquietudes.

5.2. Transferencia de material

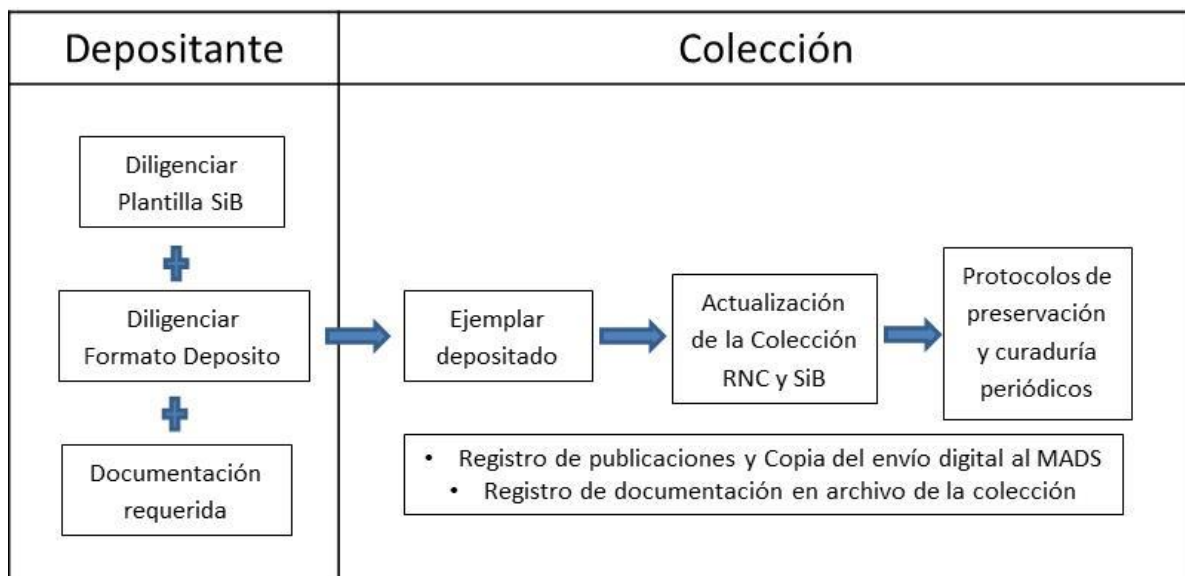
En caso de requerir un ejemplar mediante transferencia, préstamo o canje u otro tipo de actividad que involucre la entrega de material de la colección, se deberá suscribir un acuerdo de transferencia de material entre las partes interesadas siguiendo todas las disposiciones legales vigentes, especialmente aquellas referentes a importación/exportación y movilización en el territorio nacional de especímenes (Artículos 2.2.2.9.1.4, 2.2.2.9.1.9, 2.2.2.9.1.10, 2.2.2.9.1.11, 2.2.1.6.1.1 del Decreto 1076 de 2015 y demás normativa nacional o regional aplicable).

Pasos requeridos para la transferencia de material:

- Diligenciar el Formato de Transferencia (Anexo 8), al reverso del formato destacar las condiciones bajo las que se realiza la transferencia.
- Suscribir un acuerdo de transferencia de material entre las partes.
- Adjuntar la documentación legal en la cual se autoriza la transferencia de material (e.g. permiso de recolección con fines de investigación, Contrato de Acceso a Recursos Genéticos, Permiso de Investigación Científica no Comercial, registro de la colección biológica ante el instituto Humboldt).
- En caso de requerir la exportación internacional de algún espécimen, solicitar el permiso de exportación de especímenes no Cites según lo indicado en la página web <https://www.sivirtual.gov.co/memoficha-tramite/-/tramite/T605>. El interesado deberá tramitar el permiso de importación del lugar del destino según la legislación correspondiente. Una vez otorgado el permiso, solicitar la respectiva verificación ante la Autoridad Ambiental Competente en puerto para la revisión de las muestras objeto de exportación.
- El director y el investigador encargado realizarán seguimiento del acuerdo de transferencia de material con el fin de garantizar su cumplimiento.

6. Protocolo de gestión de información

El procedimiento que se realiza para asegurar y resguardar la calidad de la información asociada a los ejemplares de la colección se incluyen en el siguiente flujograma.



El flujograma describe los siguientes pasos:

- El depositante debe diligenciar la plantilla de información asociada a los especímenes según los requisitos del Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB Colombia) y la plantilla anexa (Anexo 2) y el formato de depósito (Anexo 1). Adicionalmente debe anexar toda la documentación requerida para poder realizar el depósito del ejemplar.

- Posteriormente el director de la colección o delegado define si el ejemplar cumple con todos los requisitos para el depósito del mismo. En caso negativo o afirmativo se informa al depositante por medio escrito.
- En caso de que el ejemplar sea depositado en la colección, el director de la colección o delegado realizará las rutinas de gestión de información para la actualización del Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas en el aplicativo en línea <http://rnc.humboldt.org.co/> e igualmente ingresará la información al sistema de información sobre biodiversidad de Colombia (SiB) en caso de que se requiera.
- El ejemplar depositado y toda la colección seguirá los protocolos de preservación y curaduría establecidos en este documento.
- Durante todo el proceso de depósito, actualización y preservación y curaduría, se realizarán registros de las publicaciones derivadas y se mantendrá una copia del envío de dicha información digital al Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS). Toda la documentación referida a la colección será archivada en el archivo de la colección de microorganismos de la Universidad EAFIT.

7. Plan de emergencia

Riesgos potenciales que afectarían la colección de microorganismos:

- 1) Daño de congelador (-80°C)
- 2) Desplome estructural

Para mitigar estos riesgos se implementarán las siguientes medidas en caso de poder ser implementadas:

- En caso de ser posible, la colección de microorganismos tendrá dos copias del cepario. Cada copia estará almacenada en congeladores diferentes, con el fin de mitigar el riesgo de daño del equipo.
- Adicionalmente los congeladores cuentan con alarmas para prevenir el descongelamiento imprevisto. En caso de la activación de una alarma, la colección allí contenida será transferida a un congelador en buen estado de funcionamiento.
- En caso de desplome estructural se seguirán las disposiciones de emergencia de la Universidad EAFIT.

8. Estrategia de divulgación y educación

La información y conocimiento que alberga la colección podrá ser divulgada en cualquiera de las diferentes fuentes:

- Publicación en la plataforma SiB Colombia.
- Publicación de artículos científicos en revistas indexadas nacionales e internacionales.
- Participación en eventos científicos (congresos, simposios, seminarios entre otros).
- Página web del Instituto Humboldt.
- Página web de la Universidad EAFIT.
- Entre otros relevantes.

Referencias

http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/c/cervantes/clases/sistem/Cuidado_Manejo_y_Conser_vacion_de_las_Colecciones_Biologicas.pdf.

http://www.humboldt.org.co/images/pdf/F_protocolodededepositoejemplares.pdf

http://www.humboldt.org.co/images/pdf/G_protocolodedepositodemuestras.pdf

9. Anexos

Anexo 1. Formato de depósito

Anexo 2. Plantilla de información asociada a los especímenes

Anexo 3: Protocolo de almacenamiento de Bacterias formadoras de endosporas.

Anexo 4: Protocolo de almacenamiento de hongos filamentosos patógenos de plantas

Anexo 5: Protocolo de almacenamiento de microalgas

Anexo 6: Protocolo de almacenamiento de levaduras.

Anexo 7. Formato de consulta.

Anexo 8. Formato de transferencia de material

Anexo 1. Formato de Constancia de Depósito

Formato de Constancia de Depósito			
Depósito No. _____		Fecha AAAA/MM/DD	
Datos de la colección			
Nombre de la colección		Número RNC	Acrónimo
Datos del depositante			
Documento que acredite la obtención legal	Nombre del titular del permiso		NIT o CC
	Tipo	Número y fecha	Autoridad ambiental
Nombre del depositante		Identificación ____ CC ____CE No.	
Cargo		Correo electrónico	
Dirección de correspondencia			Teléfono
Información asociada a los especímenes			
Es indispensable anexar la plantilla de información asociada a los especímenes depositados (Anexo 2)			
Número total de especímenes depositados _____	Ubicación geográfica de recolecta _____ _____ _____		
Número de especímenes por grupo taxonómico			
Microorganismos	Protista _____	Eubacteria _____	Archaeobacteria _____
Fungi	Hongos _____	Liquenes _____	
Observaciones			
Lista de chequeo de anexos			
Anexe documentación que acredita la procedencia legal. ☐			
Anexe Plantilla de la información asociada a los especímenes a depositar. ☐			
Anexe copia de publicación científica de la descripción, en el caso de especímenes tipo. ☐			

Nombre y firma
Identificación
Persona a cargo de la colección

Nombre y firma
Identificación
Depositante de especímenes

Instrucciones Formato Constancia de Depósito			Diligencia
General	Depósito No.	Consecutivo de depósito de la colección biológica	Colección
	Fecha	Fecha de presentación del formato ante la colección biológica, utilice el esquema AAAA/MM/DD	Colección
Datos de la colección	Nombre de la colección	El nombre que identifica la colección en la que se depositan los especímenes de acuerdo al registro nacional de colecciones (RNC) Puede consultar el RNC en: http://rnc.humboldt.org.co/index.php/registros/colecciones	Colección
	Número RNC	Número del registro nacional de colecciones (RNC) de la colección que recibió los especímenes. Ejemplos: "191", "206" Puede consultar el RNC en: http://rnc.humboldt.org.co/index.php/registros/colecciones	Colección
	Acronimo	Acronimo que identifica la colección en la que se depositan los especímenes de acuerdo al registro nacional de colecciones (RNC) Puede consultar el RNC en: http://rnc.humboldt.org.co/index.php/registros/colecciones	Colección
Datos del depositante	Nombre del titular del permiso	Nombre legal de la institución titular del permiso. Ejemplos: "Universidad Nacional de Colombia" Nota: Si es un permiso individual de recolección otorgado a una persona natural que no está afiliada a una institución o entidad, indique el nombre del titular.	Depositante
	NIT o CC	Número de Identificación Tributaria (NIT) de la entidad titular del permiso. Ejemplo: "586697465-1" Nota: Si es un permiso individual de recolección otorgado a una persona natural que no está afiliada a una institución o entidad, indique el número de cédula del titular.	Depositante
	Tipo	Tipo de documento que acredite la obtención legal de los especímenes. Ejemplos: Permisos de recolecta, Contrato de acceso a recursos genéticos, Acta de entrega por parte de autoridad ambiental o instituto del SINA.	Depositante
	Número y fecha	Número del documento que acredite la obtención legal entregado por la autoridad ambiental. Ejemplos: "2345 de 2013", "0985 de 2013".	Depositante
	Autoridad ambiental	Nombre de la autoridad ambiental que otorga el permiso Ejemplos: "ANLA"; "CORPOAMAZONIA"	Depositante
Datos del depositante a	Nombre del depositante	Nombre de la persona que en representación del titular del permiso hace entrega de los especímenes.	Depositante
	Identificación ____ CC ____ CE No.	Tipo y número de identificación de la persona que en representación del titular del permiso hace entrega de los especímenes.	Depositante
	Cargo	Cargo de la persona que en representación del titular del permiso hace entrega de los especímenes.	Depositante
	Correo electrónico	Correo electrónico de la entidad o del encargado que deposita los especímenes.	Depositante
	Dirección de correspondencia	Dirección para envío de correspondencia de la entidad o del encargado que deposita los especímenes.	Depositante
	Teléfono	Teléfono de contacto de la entidad o del encargado que deposita los especímenes.	Depositante
Información asociada a los especímenes	Número total de especímenes depositados	Indique el número total de especímenes depositados.	Depositante
	Ubicación geográfica de recolecta	Indique las localidades de recolección de especímenes.	Depositante
	Número de especímenes por grupo taxonómico	Indique cuantos especímenes (lote o individuo) fueron recolectados para cada grupo taxonómico.	Depositante
	Observaciones	Indique observaciones que considere pertinentes sobre el estado de recepción de los ejemplares. P. ej. estado de preservación regular, requiere tratamiento	Colección
General	Lista de chequeo de anexos	Anexe y marque con una equis que presenta la documentación que acredita la procedencia legal.	Depositante y Colección
	Lista de chequeo de anexos	Anexe y marque con una equis que presenta la plantilla con la información asociada a los especímenes a depositar.	Depositante y Colección
	Lista de chequeo de anexos	Anexe y marque con una equis si presenta copia de publicación científica de la descripción (solo para depósito de especímenes tipo).	Depositante y Colección
	Persona a cargo de la colección	Complete con el nombre, identificación y firma de la persona a cargo de la colección que realiza la recepción de los especímenes.	Colección
	Depositante de especímenes	Complete con el nombre, identificación y firma del depositante de los especímenes.	Depositante

Plantilla de la información asociada a los especímenes

A través de esta plantilla se facilita el proceso de estandarización de la información asociada a recolectas definitivas en el marco de permisos de recolección o de contratos de acceso a recursos genéticos. Basada en el estándar Darwin Core la Plantilla de registros biológicos del CR-SIB (<http://www.sibcolombia.net/web/sib/cr-sib>), la plantilla contiene 41 elementos que son de utilidad al momento de depositar sus especímenes en una colección biológica.

En la pestaña *Plantilla datos asociados* cada uno de los **elementos** debe interpretarse como una **columna**. Las celdas de la primera fila indican el nombre del elemento, al hacer clic será redirigido a la hoja *Definiciones plantilla* la cual contiene la definición y en la mayoría de casos ejemplos del elemento seleccionado.

Convenciones

Obligatorio

Elemento indispensable para documentar adecuadamente un registro biológico depositado en una colección biológica.

Recomendado

Elemento que aunque no es obligatorio, es recomendado en la documentación de un buen registro



Haga clic para **regresar** a la hoja Plantilla datos asociados

Descargo de responsabilidad

El depositante de los especímenes publicador es responsable por la calidad y veracidad de la información reportada ante la colección biológica que recibe el material y la autoridad ambiental competente podrá evaluar la idoneidad de la información documentada en cualquier momento. La colección biológica no se hace responsable por la información reportada.

Última revisión: Octubre de 2015

Planilla de información asociada a los especímenes

Institution Code	Institution ID	Other Catalog Numbers	Basis Of Record	Of preparations	Occurrence ID	Collection Code	Collection ID
Nombre de la entidad	NIT	Número del permiso de recolección	Tipo del registro	Tipo de la muestra	ID del registro biológico	Nombre de la colección	Número RNC

Catalog Number	preparastions	Recorded By	Record Number	Identified By	Occurrence Remarks	Event Date	country
Número de catálogo	Preparaciones	Nombre del colector	Número de colector	Identificado por	Comentarios del registro biológico	Fecha del evento	País

State Province	county	locality	Decimal Latitude	Decimal Longitude	Geodetic Datum	Minimum ElevationInMeters	Máximum ElevationInMeters
Departamento	Municipio	Localidad	Latitud decimal	Longitud decimal	Datum geodésico	Elevación mínima en metros	Elevación máxima en metros

Minimum Depth In Meters	Máximum Depth In Meters	Location Remarks	Data Generalizations	Scientific Name	Taxón Rank	Identification Qualifier	Identification Remarks
Profundidad mínima en metros	Profundidad máxima en metros	Comentarios de la ubicación	Información retenida	Nombre científico	Categoría del taxón	Calificador de la identificación	Comentarios de la identificación

kingdom	phylum	class	order	family	genus	Specific Epithet	Infraspecific Epithet	Vernacular Name	Individual Count
Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Epíteto específico	Epíteto infraespecífico	Nombre común	Número de individuos

Anexo 3. Protocolo Conservación de Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora

1. OBJETIVO:

Almacenar y conservar la biomasa de bacterias aeróbicas formadoras de endospora (BAFE) a una temperatura de -80°C en medio de cultivo líquido y glicerol.

2. DESCRIPCIÓN

2.1. Principio del método

El objetivo de la preservación de las bacterias, es mantener una masa o densidad bacteriana a una concentración en la cual las células se mantengan viables y disponibles para la duplicación y que sean estables genéticamente. Las bacterias almacenadas en tubos cerrados pueden bajar su viabilidad, aumentando la velocidad de muerte, debido principalmente a las interacciones del medio y la célula. Para contrarrestar esta situación de disminución de densidad poblacional, existe una metodología que logra disminuir las reacciones deletéreas, usando temperaturas bajas de almacenamiento, con equipos como refrigeradores (-20°C a -40°C), congeladores (hasta -86°C) y criocongeladores (hasta -140°C).

Generalmente, entre más baja sea la temperatura de almacenamiento, hay una mayor conservación y viabilidad en las células. La dificultad del uso de la técnica de congelación para la conservación y almacenamiento, son los cristales de hielo formados a estas bajas temperaturas, ya que pueden dañar las células por deshidratación y ruptura de membranas. Para disminuir los efectos negativos de la congelación, se utiliza normalmente un agente crioprotectante como el glicerol, disminuyendo el punto de congelamiento de las células. Existen otros protectantes como trehalosa, dimetil sulfoxido (DMSO), glicina, betaína, leche descremada, glutamato y sacarosa.

Es por esto que se recomienda adicionar un agente protectante (glicerol en este protocolo) a una concentración de 15 al 20% aproximadamente al medio de conservación, con el fin de mantener las células viables bajo condiciones de congelamiento (-80°C).

2.2. Equipos

Balanza analítica, Autoclave, Cabina de bioseguridad, Micropipeta de 1 mL, Incubadora a 30°C, Agitadores, Congelador de conservación, Centrífuga

2.3. Reactivos

TSA (Tryptic Soy Agar) – Marca Oxoid ® o Merk ®, TSB (Tryptic Soy Broth) – Marca Oxoid ® o Merk ®, Glicerol, Bacto-Agar (Marca BD ®).

2.4. Materiales

Agua destilada estéril, Cajas de Petri 100x15 mm, Erlenmeyer, su tamaño dependerá de la cantidad de medio a preparar, Marcadores indelebles, Mechero, Encendedor, Puntas para micropipetas de 1 mL, Tubos viales, Tubos falcon (15 mL)

3. DESARROLLO DEL MÉTODO

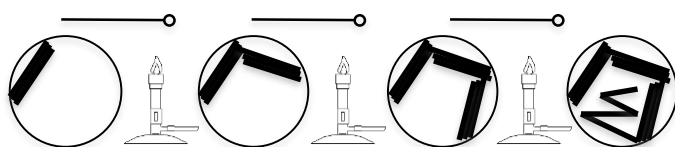
3.1. Preparación del Medio de Cultivo Sólido

- Preparar medio TSA a una concentración del 50% equivalente a 20 g/L, suplementado con 7.5 g/L de bacto-agar.
- Esterilizar el material por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y 20 psig
- Servir de 20 a 25 mL aproximadamente del medio TSA en las cajas de Petri (previamente estériles), dentro de la cámara de flujo laminar, evitando contaminación del medio.
- Secar de 3 a 5 días las cajas con TSA en un lugar fresco y seco, para su utilización posterior.

3.2. Siembra de la bacteria en medio sólido

- Tomar una asada o una colonia de la bacteria a conservar y sembrarla en el TSA por agotamiento (o francés) (Figura 1).
- Incubar de 2 a 3 días a 30°C.

Figura 1. Siembra de microorganismo por agotamiento



3.3. Preparación del medio de cultivo líquido

- Preparar el medio TSB a una concentración de 24 g/L y adicionar un volumen equivalente al 20% del volumen del recipiente en un Erlenmeyer, el cual se tapa con un tapón de gaza y algodón.
- Esterilizar el material por 15 minutos a una temperatura de 121°C y 20 psig.

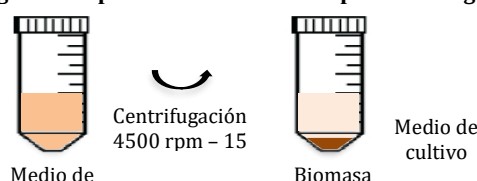
3.4. Crecimiento microbiano en medio líquido

- Tomar una colonia pura de la bacteria a conservar de la caja de Petri (antes sembrada en el numeral 3.2) e inocular en el medio de cultivo líquido (TSB) previamente estéril.
- Agitar entre 100 a 200 rpm aproximadamente, por 24 horas a 30°C, con el fin de aumentar la población bacteriana en el medio de cultivo.

3.5. Obtención de la biomasa microbiana

- Verter el volumen de la fermentación realizada anteriormente a tubos falcon estériles en la cámara de flujo laminar.
- Centrifugar a 4500 rpm por 15 minutos. En esta etapa, se realiza una separación de biomasa (sólidos o pellet) y sobrenadante (líquido) (Figura 2).

Figura 2. Separación de la biomasa por centrifugación del medio de cultivo



3.6. Medio de cultivo de conservación

- Preparar medio TSB a una concentración de 24 g/L con glicerol al 20% (v/v).
- Esterilizar a las condiciones antes especificadas (15 minutos, 121°C y 20 psig). Este medio se utiliza para la conservación y almacenamiento de la biomasa.
- Nota: no almacenar el medio de conservación por más de 1 día, debe ser de uso inmediato.

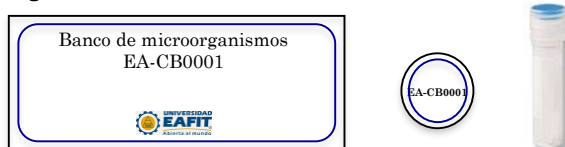
3.7. Conservación de la biomasa microbiana

- Re suspender los sólidos separados (pellet) en la centrifugación (biomasa) del numeral 3.5, en 1 o 1.5 mL del medio de conservación (TSB con 20% de glicerol estéril).
- Adicionar en los crioviales de 2 mL en cabina de flujo laminar con puntas estériles y una micropipeta.
- Almacenar en el freezer a -80°C.

3.8. Rotulación de los crioviales

- Realizar una rotulación estándar del cepario respectivo, siguiendo una codificación y numeración de la misma. Esta rotulación se debe hacer encima (en la tapa) y a lo largo del tubo, con un marcador apropiado o autoadhesivo.
- Llevar un control digital del cepario con los nuevos crioviales añadidos y en las cajas donde se almacenan.
- Realizar una tabla con los nombres de cada cepa, manteniendo un mismo orden siempre (Figura 3).

Figura 3. Rotulación de los crioviales



3.9. Control de calidad

- Sembrar por agotamiento el microorganismo almacenado en medio de cultivo sólido (TSA).
- Incubar a 30°C por 48 horas.
- Verificar morfología y otras características propias de la cepa conservada para verificar su pureza.

Referencias

<http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/aguidetobacteriapreservation.htm>

Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J. and Bonilla, R. (2013) "Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*". Univ. Sci. 2013, Vol. 18 (2): 129-139.

Anexo 4: Protocolo de almacenamiento de hongos filamentosos patógenos de plantas

Objetivo: Almacenar y conservar estructuras de resistencia de hongos filamentosos bajo dos técnicas de conservación.

Generalidades de los métodos:

Para establecer una colección confiable, es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se consignan. La conservación de este tipo de microorganismos tiene como fin último mantenerlos viables, eliminando la necesidad de repiques frecuentes, que puedan generar mutaciones o pérdida de virulencia en general. En la actualidad existen métodos para conservar los hongos a mediano y a largo plazo, los cuales serán implementados según los requerimientos de cada proyecto o investigador, sin embargo, se recomienda la implementación de dos de estas técnicas que permita la permanencia viable del cepario de laboratorio.

Equipos necesarios

Autoclave, Hemocitómetro o cámara de Neubauer, Cabina de bioseguridad, Micropipeta de 1 mL, Congelador-Refrigerador.

Reactivos

PDA (Potato Dextrose Agar) – Marca Difco™, SDA (Sabouraud Dextrose Agar)- Marca Difco™

Materiales

Agua destilada estéril, Cajas Petri, Erlenmeyer, papel aluminio, Marcadores indelebles, Mechero, Encendedor, Tubos falcon (50 mL), Semillas de trigo o maíz.

Método

1. Uno de los métodos de conservación de hongos filamentosos, se realiza en semillas de trigo, para este se requiere:
 - Inoculación en medio de cultivo:
 - ✓ Preparar medio de cultivo sólido PDA o SDA y esterilizar a 15 psi-121°C durante 20 minutos
 - ✓ Una vez finalice el proceso de esterilización, acidificar el medio de cultivo con ácido láctico al 40% antes de dispensarlo en las cajas petri. (Realizar procedimiento en cámara de flujo laminar)
 - ✓ Permitir la solidificación en las cajas petri por un periodo aproximado de 20 minutos
 - ✓ Realizar el repique del microorganismo filamentoso de interés con la ayuda de un asa de punta, alcanzando tres puntos distantes en la caja de petri y permitir su crecimiento entre ocho y quince días a 24±2°C
 - Preparación de las semillas para almacenamiento:
 - ✓ El tipo de semilla a usar podrá variar según el hongo filamentoso que se desee almacenar, en cualquier caso, será indispensable que realice lo que a continuación se especifica:
 - ✓ En tubos falcon de 15 ml, disponer semillas que cubra la mitad de la capacidad del recipiente.
 - ✓ Esterilizar el material a 121°C-15 psi, durante 20 minutos, teniendo la precaución de dejar las tapas de cada recipiente ligeramente sueltas para evitar presurización de los mismos.
 - ✓ Dejar en temperatura ambiente durante una hora antes de ser utilizados.
 - Inoculación en semillas:
 - ✓ Una vez el microorganismo se encuentre crecido en el medio de cultivo sólido, adicionarle 20 ml de agua destilada estéril más tween 20% v/v y con la ayuda de un asa bacteriológica raspar el crecimiento del hongo para permitir el desprendimiento de estructuras reproductivas y de resistencia.

- ✓ Adicionar la solución obtenida en un tubo falcon de 50 ml estéril y realizar diluciones seriadas hasta 10^{-4}
 - ✓ Utilizando cámara de Neubauer, contar el número de conidias en la dilución 10^{-4} (ver guía instructiva de laboratorio)
 - ✓ Preparar una solución de propágulos a una concentración final de 1×10^8 conidias/ml
 - ✓ Adicionar 1 ml de solución a cada uno de los tubos falcon que contienen las semillas y dejar en incubación durante cinco días hasta observar crecimiento miceliar.
 - ✓ Cada recipiente estará debidamente rotulado con código y fecha de almacenamiento.
 - ✓ Almacenar en refrigeración por un periodo no superior a seis meses, transcurrido este tiempo, es necesario revisar viabilidad.
2. El método utilizado con mayor frecuencia es la desecación en papel de filtro (Gato 2010, Weng et al. 2005); esta conservación se realiza ubicando pequeños trozos de papel filtro en las cajas Petri donde se inoculó el microorganismo de interés, ésta tiene como objetivo el crecimiento uniforme sobre el papel. Posterior a ello se retiran los trozos y se disponen a secar a 35°C . Una vez seco el papel filtro se almacenan en sobres de papel debidamente rotulados a temperatura de refrigeración de 0 a 4°C (Sosa et al. 2011, Crahay et al. 2012, Ramos et al. 2006).

Anexo 5: Protocolo de almacenamiento de microalgas

1. OBJETIVO:

Almacenar y conservar microalgas a una temperatura de -80°C en medio de cultivo líquido empleando diferentes crioprotectores (dimetilsulfóxido (DMSO) y/o glicerol).

2. DESCRIPCIÓN

2.1. Principio del método

Gracias a los efectos de inhibición, de los procesos físicos y químicos sobre los microorganismos fotosintéticos causados por las bajas temperaturas o congelación, es posible lograr el mantenimiento y la estabilidad genética de las microalgas a través del tiempo. Para los procesos de criopreservación de microalgas deben considerarse la división de la cepa, su morfología (tamaño y forma) y las condiciones de enfriamiento y almacenamiento de la muestra. La principal dificultad de esta técnica de conservación a -80°C radica en la formación de cristales de hielo que pueden generar ruptura de la membrana celular y disminuir la viabilidad de las células microalgales, con el fin de contrarrestar este efecto se utilizan crioprotectores (dimetilsulfóxido, glicerol, metanol, entre otros) a diferentes concentraciones que permiten la conservación de cada especie.

2.2. Equipos

Autoclave, cámara de flujo laminar, micropipeta de 1 mL, congelador de conservación a -80°C, agitador, luz LED blanca.

2.3. Reactivos

Dimetilsulfóxido, glicerol, medio de cultivo BBM, Agar-Agar.

2.4. Materiales

Agua destilada estéril, cajas de Petri, crioviales de 2 mL, erlenmeyer de 100 mL, puntas para micropipeta de 1 mL, filtros de poliamida de 0.2 µm de diámetro, Mechero, Encendedor.

3. Metodología

3.1 Preparación del Medio de Cultivo Sólido

- Preparar medio BBM y adicionar 15 g/L de Agar-Agar.
- Esterilizar el medio de cultivo y las cajas de Petri por 15 minutos a 121 °C y 29.7 psi
- Servir en la cámara de flujo laminar el medio de cultivo, adicionando entre 25 y 30 mL del medio BBM a las cajas de Petri.
- Secar de 2 a 3 días las cajas con BBM en un lugar fresco y seco.

3.2 Siembra de la microalga en medio sólido

- Tomar una asada de la microalga a conservar y sembrarla en BBM sólido por agotamiento.
- Incubar de 10 a 15 días a 30°C con fotoperiodo de luz LED blanca 12:12 e intensidad de luz de 32 µmol/m²s.

3.3 Verificación de las células microalgales

- Tomar una micrografía en el objetivo de 100X del cultivo líquido de la microalga seleccionada para el proceso de criopreservación.
- Generar una carpeta y nombrarla **aammdd-SP1-Criopreservación**.
- Guardar la micrografía en la carpeta generada anteriormente y marcarla así: **aammdd-SP1-Criopreservación-Acrónimo de la cepa**. Esto permitirá realizar comparaciones morfológicas cuando la cepa se active nuevamente.

3.4 Medio de cultivo de conservación

- Preparar medio BBM líquido y esterilizar a las condiciones antes especificadas (15 minutos, 121°C y 29.7 psig)
- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un filtro de membrana de poliamida de 0.2 µm de diámetro filtrar el volumen necesario de crioprotector (DMSO y/o glicerol) para esterilizar cada reactivo.
- Adicionar el medio de cultivo BBM líquido y el volumen del crioprotector seleccionado para alcanzar la concentración necesaria de este en el criovial de 2 mL. Este procedimiento se realiza en la cámara de flujo laminar con la ayuda de la micropipeta de 1 mL y puntas estériles de 1 mL.
Nota: La relación entre medio de cultivo y crioprotector se realiza teniendo en cuenta que la concentración este varía entre 5 y 10% y entre 10 y 20% para el DMSO y el glicerol, respectivamente según la especie a conservar.

3.5 Conservación de las células microalgales

- Resuspender 4 colonias de la microalga seleccionada en el criovial que contiene medio BBM y el crioprotector seleccionado.
- Agitar con vortex cada criovial y marcarlo de la siguiente forma **aammdd-cepa-tratamiento**
- Almacenar a -80°C.

3.6 Verificación de las células microalgales

- Sembrar la cepa almacenada a -80°C por agotamiento en medio de cultivo BBM sólido.
- Incubar de 10 a 15 días a 30°C con fotoperiodo de luz LED blanca 12:12 e intensidad de luz de 32 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.
- Seleccionar una colonia y diluirla en 0.1 mL de agua estéril.
- Tomar una micrografía en el objetivo de 100X de la suspensión microalgal.
- Verificar la morfología del cultivo con la micrografía tomada en el numeral 3.3.

Anexo 6: Protocolo de almacenamiento de levaduras.

Objetivo:

Almacenar y conservar levaduras y hongos a una temperatura de -70°C en medio de cultivo líquido y glicerol.

Metodología de conservación de levaduras y hongos:

La conservación levaduras y hongos en heladera a -70°C en crioviales, se realiza llevando una relación 1:1 de glicerol al 50% y una suspensión del microorganismo, el cual debe tener entre 10^8 - 10^9 células/ml. Esto se logra controlando el crecimiento hasta alcanzar una absorbancia entre 0.6-0.8 como se describe a continuación.

De una cepa en agar o en medio líquido tomar una ansada o una cantidad suficiente para inocular en medio líquido LB o en medio Sabouraud. para levaduras y hongos (como se explica en el ítem de medios de cultivo a continuación).

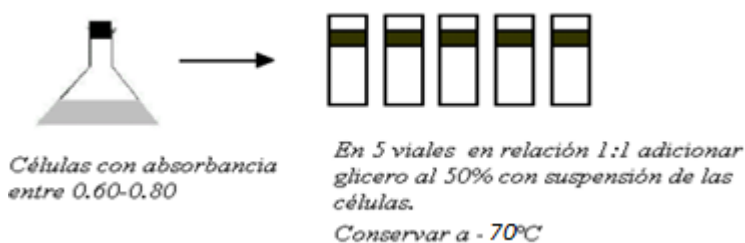
Incubar en agitación 180 rpm a la temperatura y tiempo requerido para el crecimiento del microorganismo.

Se hacen lectura de la densidad óptica así;

Tomar 1 ml de suspensión celular y adicionarlos en otro erlenmeyer con 50 ml de caldo.

Hacer una primera lectura sin incubación siempre utilizando la celda blanco con medio.

Leer cada hora hasta llegar a una absorbancia de 0.6-0.8 a una longitud de onda de 600 nm.



Metodología de conservación de hongos esporulados:

La conservación de hongos esporulados se realiza en tirillas de papel filtro estéril como soporte. Para ello, al medio sólido se le adiciona agua destilada estéril con una gota de tween 80 para preparar una suspensión de esporas. Posteriormente, se impregnan las tirillas de papel filtro y se secan en la cámara de flujo laminar. Finalmente, se almacenan en cajitas petri o en tubos eppendorff en el congelador.

Anexo 7. Formato de consulta.

Datos de la colección		
Nombre de la colección		
Acrónimo	Número RNC	
Datos del visitante		
Nombre del visitante	Identificación	
Institución del visitante	Cargo	
Correo electrónico	Teléfono	
Datos de la consulta		
Fecha de inicio AAAA/MM/DD	Fecha de terminación AAAA/MM/DD	Duración de la visita _____ ☐ horas ☐ días ☐ semanas
Grupo taxonómico o subcolección		
Objeto de la visita		
Observaciones y sugerencias		
Equipos y materiales asignados durante la visita		
Firma _____ Nombre _____ Curador o persona encargada		Firma _____ Nombre _____ Visitante

Anexo 8. Formato de transferencia de material

Datos de la colección		
Transferencia No.	Acrónimo	
Número RNC _____	Nombre de la colección	
Institución	Nombre del curador o persona encargada	
Dependencia	Dirección	
Teléfono	Correo electrónico	
Datos del solicitante		
Nombre del solicitante	Tipo de identificación del solicitante ☐ CC ☐ PAS ☐ CE ☐ NIT	Número de identificación del solicitante
Entidad	Cargo	
Dirección de correspondencia (incluir código postal)	Ciudad	País
Correo electrónico	Teléfono	
Datos de la transferencia		
Tipo de transferencia ☐ Préstamo ☐ Para exposición ☐ para identificación ☐ Canje ☐ Donación ☐ Devolución		
Fecha de inicio AAAA/MM/DD	Fecha de devolución AAAA/MM/DD	
Objeto o proyecto en el que se enmarca la transferencia		
Grupo taxonómico o subcolección		
Código o número de catálogo del ejemplar transferido	Identificación taxonómica	Descripción
Firma _____ Nombre _____ Curador o persona encargada		Firma _____ Nombre _____ Solicitante

