

# Estudio sobre la recuperación de diferentes cepas microbianas de colección, mantenidas en congelación, en los diferentes tipos de CRIOTECA®\* MICROKIT

Jorge Sanchis Solera, biólogo, director Técnico de Laboratorios MICROKIT, S.L.

Beatriz Roqués Goyeneche, bióloga, ex responsable de Control de Calidad de Laboratorios MICROKIT

Antonio de la Llana, químico, tecnólogo de alimentos, ex responsable de Seilasesoría de MICROKIT

Eva M<sup>a</sup> Sánchez Pozuelo, bióloga y tecnóloga de alimentos, responsable de Logística de MICROKIT

Soledad Miranda Roldán, bióloga, responsable de Producción de Laboratorios MICROKIT, S.L.

Natalia Rook González, bióloga, asesora técnico-comercial de Laboratorios MICROKIT, S.L.

Sylvia Ajates Rodríguez, química, responsable de Informática de Laboratorios MICROKIT, S.L.

## 1. Introducción, kits CRIOTECA® y objetivos

Laboratorios MICROKIT es pionera en el diseño de kits para conservación de cepas microbianas por congelación, y desarrolló ya desde 1995, sus CRIOTECA®, crioviales con líquido criogénico y perlas de porcelana porosa, que permiten la reutilización de la misma generación microbiana en un mismo vial durante años, lo que ahorra espacio en los congeladores, contaminaciones y mutaciones. A petición (y con la inestimable ayuda) de los mayores ceparios oficiales y privados de España, ha ido diversificando el rango, hasta llegar a la completa gama actual:

1. **Clásica:** Para uso general (con caldo criogénico idéntico al que tienen las demás marcas)
2. **YM:** Mejorada con líquido criogénico especial para más larga conservación de hongos (levaduras y mohos)
3. **Marina:** Mejorada con líquido criogénico especial para microorganismos halófilos (*Vibrio spp...*)
4. **Skim Milk:** Mejorada con líquido criogénico que contiene leche desnatada, para microorganismos difíciles, que duraban poco en las clásicas pero también válida para los microorganismos generales
5. **Campy:** Mejorada con caldo criogénico específicamente desarrollado para *Campylobacter/Helicobacter*
6. **Aquatica:** Mejorada con líquido criogénico especial para los microorganismos acuáticos, incluida *Legionella*

7. **Anaeroteca:** En este caso se trata de tubos con un medio de conservación inédito especialmente diseñado para conservación sin congelar de anaerobios (*Clostridium...*).

Dada la gran diversidad del rango de CRIOTECA® con respecto a la única ofrecida por otras marcas internacionales, numerosos usuarios nos preguntan a menudo cuál es la ideal para los microorganismos concretos que ellos usan, y nuestra respuesta se atenia siempre a los criterios de validación bibliográfica de los caldos utilizados.

Con este estudio pretendemos **confirmar cuáles son las mejores CRIOTECA® para cada cepa**, comparando durante 3 años los resultados de recuperación cualitativa tras congelar a -20 °C, la temperatura crítica de mantenimiento de cepas congeladas, por encima de la cual los microorganismos no resisten ni siquiera un año.

Deseamos que tras este estudio, la respuesta a "¿qué uso para esta cepa?" quede claramente contestada.

## 2. Método

Las instrucciones de uso de CRIOTECA® dicen claramente que una vez inoculadas con el cultivo puro (colonia, caldo, líofilo, lenteja, disco o lo que sea), deben congelarse a una temperatura comprendida entre -20 y -60 °C.

\***(CRIOTECA® es marca registrada de MICROKIT y, aunque por ser pioneros, se está extendiendo el uso de esta palabra para designar cualquier criovial con líquido criogénico, reiteramos que su correcta utilización es para designar los crioviales con perlas de porcelana porosa y caldos criogénicos diseñados y fabricados por MICROKIT.)**



**Figura 1. Fotografía de 4 de las 7 CRIOTECA®: Skim Milk (verde), Aquatica (roja), Clásica (amarilla) y Campy (azul).**

Sin embargo, hemos preferido estudiar la viabilidad de todos los microorganismos más usuales, a la temperatura más crítica,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por encima de la cual toda la bibliografía está de acuerdo en que las cepas no se recuperan, por formación de cristales de hielo intracelulares. Cuanto más rápida y a más baja temperatura sea la congelación, mucho más tiempo duran los microorganismos en forma viable, de modo que **este estudio no debe llevar a la falsa conclusión de que las fechas concluidas son la fecha máxima de caducidad de las CRIOTECA®,** que todo usuario habitual sabe que puede demorarse, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , al menos hasta incluso 11 años (por lo que sabemos del primer lote que fabricamos, hace ya 11 años).

Hemos mantenido durante tres años cada cepa congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en todos los tipos de CRIOTECA® disponibles hasta la fecha (excepto Anaeroteca, que por razones obvias queda fuera de la necesidad de este estudio). Un día cada año, durante los tres años siguientes, se resembraban todas en los medios de cultivo MICROKIT® adecuados para su óptima recuperación y se incubaban en las condiciones óptimas para su crecimiento (en general, bacterias cuatro horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  en BHI Broth para revitalización y posterior aislamiento 48-72 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  en TSA-LPT-Neutralizing Agar; hongos 18 horas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en Sabouraud polimicológico Broth y posterior aislamiento 5 días a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en Potato Dextrose Agar; en casos particulares como por ejemplo Legionella, caldo GVPC 24 horas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y Agar GVPC una semana a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Las ufc obtenidas se confirmaban como pertenecientes a la cepa inoculada, y no a posibles contaminaciones ambientales durante la manipulación. No se contaban, ya que tras efectuar enriquecimientos serían datos inútiles. Lo que sí se apuntaba era el nivel de recuperación cualitativo visual:

NO: No recupera

SI: Recupera

SIII: Recupera con gran intensidad

SIIII: Recupera con máxima intensidad (incontables, spreadings, desbordamientos de la placa...).

### 3. Datos

Nos remitimos a los resultados plasmados en la **Tabla** anexa a este estudio.

Evidentemente, los microorganismos que se conservan viables durante los tres años en una CRIOTECA® concreta, es probable que sigan viables durante mucho más tiempo, pero necesitábamos resultados sin más demora y creemos suficientes tres años para obtener conclusiones fiables.

## conservación de cepas microbianas

### 4. Conclusiones de los resultados obtenidos en los tres primeros años de comparación (2004, 2005, 2006) Recomendaciones de MICROKIT

Aunque estas conclusiones están sesgadas al mantenimiento en las peores condiciones posibles ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) son útiles para todos los laboratorios, ya que los que mantienen las CRIOTECA® a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  pueden también extrapolar que: si un microorganismo concreto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se conserva viable un mínimo de 3 años en CRIOTECA®-SKIM MILK pero solo 2 años en CRIOTECA®-CLÁSICA, por ejemplo, entonces si a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  se conserva viable, por ejemplo, 6 años en CRIOTECA®-CLÁSICA cabe esperar que se conserve un mínimo de 9 años en CRIOTECA®-SKIM MILK.

**1. Primer puesto:** Los resultados hablan por sí solos, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la mayoría de cepas se conserva viable mucho mejor en CRIOTECA®-SKIM MILK, y este dato de ser la que mejor recupera, se repite durante los tres años seguidos.

**2. Segundo puesto:** La CRIOTECA®-YM es excelente también para muchas bacterias, aunque se diseñó para hongos, comparativamente es la segunda mejor (tras CRIOTECA®-SKIM MILK) para la mayoría de cepas a los tres años.

**3. Tercer puesto:** Sin embargo y curiosamente, al primer año recuperan mejor la mayoría de microorganismos en la CRIOTECA®-CAMPY (como siempre, después de la CRIOTECA®-SKIM MILK), aunque la recuperación comparativa merma con más tiempo.

**4. La CRIOTECA®-CLÁSICA,** la más universalmente utilizada (por ser la primera que diseñamos a raíz de la bibliografía, y por ser la única que tienen los otros fabricantes de crioviales con líquido criogénico), es sólo la tercera mejor en recuperar cepas al tercer año, y la que menos cepas recupera comparativamente al primer año, por lo que resulta poco adecuada para numerosos microorganismos, como bien saben los usuarios de otras marcas y de CRIOTECA®-CLÁSICA. De ahí que en la actualidad existan tantos tipos de CRIOTECA®, diseñadas por MICROKIT® gracias a la ayuda de sus mejores clientes.

Sin embargo, debe estudiarse el resultado final de la tabla para cada microorganismo concreto, ya que hay ciertas excepciones a esta generalización. Lo ideal es que cada laboratorio **guarde este estudio junto a los protocolos de su cepario,** a fin de elegir en cada momento la CRIOTECA® ideal para cada cepa.

Debemos llamar la atención sobre el hecho de que, en este estudio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hay cepas para las que las CRIOTECA® diseñadas para ellas (como *Legionella pneumophila* en CRIOTECA®-AQUATICA) no se conservan viables, pero eso no permite extrapolar que a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  sean también ineficaces, como saben bien todos sus usuarios que mantienen sus ceparios en las distintas CRIOTECA® a temperaturas muy por debajo de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Anexo. Tabla de resultados

| CEPA  | CRIOTECA        |                 |                 |               |               |               |               |               |               |               |               |               | CAMPY 2006     |                |                |                 |                 |                 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | CLÁSICA 2004    | CLÁSICA 2005    | CLÁSICA 2006    | AQUÁTICA 04   | AQUÁTICA 05   | AQUÁTICA 06   | SKIM-MILK 04  | SKIM-MILK 05  | SKIM-MILK 06  | YM 2004       | YM 2005       | YM 2006       |                | MARINA 2004    | MARINA 2005    | MARINA 2006     | CAMPY 2004      | CAMPY 2005      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> MKTC 142           | SI              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> MKTN 11228         | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>E. coli</i> O157:H7 MKTAC 4076               | SI              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 MKTA315160      | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>E. coli</i> MKTA 0729/MKTC 516               | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>E. coli</i> MKTA O5922/MKTC 516              | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Salmonella</i> abony MKTN 6017               | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> MKTA 13048        | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Citrobacter freundii</i> MKTA 8890           | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Shigella sonnei</i> MKTC 457                 | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Aerobacter pasteurianus</i> MKTA9 492        | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Salmonella enteritidis</i> MKTA 13076        | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Serratia marcescens</i> MKTC 159             | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Proteus mirabilis</i> MKTA 14153             | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Micrococcus luteus</i> MKTA 10240            | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Micrococcus luteus</i> MKTA 1957             | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Micrococcus luteus</i> MKTA 0638             | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MKTA 6538P         | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MKTA 12228         | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MKTA 25923         | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MKTA 9027         | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> MKTA 13255       | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Bacillus cereus</i> MKTA 10876               | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Bacillus subtilis</i> MKTAB633               | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Listeria monocytogenes</i> MKTN 11924        | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Listeria ivanovi</i> MKTA 19119              | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Listeria innocua</i> MKTC 4030               | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Listeria grayi</i> MKTA 19120                | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> MKTA 13813      | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Enterococcus faecalis</i> MKTA 19433         | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Enterococcus faecalis</i> MKTA 23212         | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Enterococcus durans</i> MKTA 10541           | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> MKTA19615         | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Staphylococcus albus</i> MKTC 801            | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> MKTC 250         | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Lactobacillus casei</i> MKTA 383             | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Lepidostella pneumophila</i> MKTA 33152      | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> MKTA 7596           | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Aspergillus niger</i> MKTA 16404             | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> MKTC 2987          | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Candida albicans</i> MKTA 10231              | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> MKTA 9478        | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Schistosaccharomyces pombe</i> MKTC 1378     | SI              | SI              | SI              | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI            | SI             | SI             | SI             | SI              | SI              | SI              |
| <i>Xanthomonas maltophilia</i> MKTA 13837       | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> MKTC 1468            | NO              | NO              | NO              | SI            | NO            | NO            | SI            | SI            | NO            | NO            | NO            | NO            | NO             | NO             | NO             | NO              | NO              | NO              |
| <b>CEPAS RECUPERADAS EN CALA CRUÏA CRIOTECA</b> | <b>CLAS 84%</b> | <b>CLAS 83%</b> | <b>CLAS 82%</b> | <b>AG 89%</b> | <b>AG 89%</b> | <b>AG 89%</b> | <b>SI 71%</b> | <b>SI 71%</b> | <b>SI 42%</b> | <b>SI 37%</b> | <b>YM 55%</b> | <b>YM 55%</b> | <b>IMR 55%</b> | <b>IMR 52%</b> | <b>IMR 19%</b> | <b>CAMP 62%</b> | <b>CAMP 56%</b> | <b>CAMP 22%</b> |

Leyenda: SI = Recupera bien incluso mantenido a solo -20 °C; SIII = Recupera muy bien; SIIII = Recupera excelente; NO = No recupera mantenido a -20 °C.  
 Años de control tras inocular en 7/2003: 04 = 9/2004 (+1 año) 05 = 9/2005 (+2 años) 06 = 10/2006 (+3 años).  
 Conclusión: en general, la mejor CRIOTECA para todo tipo de cepas es la CRIOTECA Skim-Milk.  
 Nota: para cepas anaerobias véase anaeroteca.

(Véase anuncio en la sección Guía del Comprador.)