

## **Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos.**

**Autor:** Lic. Rosa Amelia Gonzáles MsC.

**Otros autores:** Lic. Nivian Montes de Oca Martínez<sup>1</sup>. Dr. C., Lic. Yamilka Riverón y Dra. Amalia Núñez.

<sup>1</sup> *Grupo de Aseguramiento de la Calidad. Dirección Calidad. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria CENSA, Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, Apdo 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.*  
Email: [nivian@censa.edu.cu](mailto:nivian@censa.edu.cu)

### **Resumen**

A través de una exhaustiva revisión de normas, regulaciones y artículos relacionados con las Colecciones de Cultivos Microbianos (Cepario) se exponen recomendaciones para el establecimiento de un Sistema de Calidad que asegure el manejo de los microorganismos que participan en los procesos de investigación, producción y servicios que brinda las institución científicas o empresas productoras. La revisión hace hincapié en los requisitos técnicos que deben cumplir las colecciones para lograr la viabilidad y mantenimiento de las características de cada cepa teniendo siempre presente a los Sistemas de Gestión de la Calidad como base de cualquier proceso que se quiera desarrollar en la industria de biológicos. Dentro de estos requerimientos se abordan los relacionados con: Documentación, Identificación y autenticidad de las cepas, Pureza, Monitoreo de viabilidad, Estabilidad de las propiedades de las cepas, Estandarización de las condiciones de crecimiento, Metodologías y protocolos de preservación estandarizados, Mantenimiento de los equipos, Normas para el suministro e intercambio de cepas, Seguridad a largo plazo, Control de las condiciones ambientales, Auditorías, Cumplimiento de las legislaciones, Personal, entrenamiento y Bioseguridad, entre otros. Se brindan recomendaciones prácticas para los responsables o curadores de colecciones de microorganismos.

### **Palabras claves**

Colecciones de cultivos, Cepario, BPL, laboratorios de microbiología y biotecnología.

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
Resumen	1
1. Introducción	3
2.1. Las colecciones de cultivos microbianos	4
2.2. Historia y Actualidad	5
2.3. Establecimiento y Operación de las colecciones de cultivos microbianos	7
2.3.1 Organización	7
2.3.2 Financiamiento	8
2.3.3 Objetivos	8
2.3.4 Recursos biológicos (valores habidos de la colección)	8
2.3.5 Personal	9
2.3.6 Preservación	9
2.3.7 Procedimiento para el depósito y autenticación del cultivo	10
2.3.8 Suministro de cultivos	11
2.3.9 Promoción y publicidad	11
2.3.10 Otros servicios	11
2.3.11 Documentación	12
2.3.12 Catálogos	12
2.3.13 Investigaciones	12
2.3.14 Entrenamiento	12
2.3.15 Normas de seguridad y calidad	13
2.3.16 Colaboración nacional e internacional	13
2.4. Preservación de cultivos microbianos	14
2.4.1 Subcultivos	14
2.4.2 Desecación	15
2.4.3 Liofilización	15
2.4.4 Congelación	16
2.5. Aseguramiento de la calidad para las colecciones de cultivos	17
2.5.1 Documentación	18
2.5.2 Identificación y autenticidad de las cepas	20
2.5.3 Pureza	20
2.5.4 Monitoreo de viabilidad	20
2.5.5 Estabilidad de las propiedades de la cepa	21
2.5.6 Estandarización de las condiciones de crecimiento	21
2.5.7 Metodologías y protocolos de preservación	21
2.5.8 Mantenimiento de los equipos	22
2.5.9 Normas para el suministro e intercambio de cepas	22
2.5.10 Seguridad a largo plazo	23
2.5.11 Control de las condiciones ambientales	25
2.5.12 Auditorías	25
2.5.13 Cumplimiento de las legislaciones	25
2.5.14 Personal y entrenamiento	25
Bibliografía	26

## 1. Introducción

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente (Llop, et al.; 1998). El estudio de microorganismos aun en laboratorios con escasos recursos, involucra frecuentemente el uso de cultivos vivos. Estos necesitan ser viables al menos durante el estudio y los experimentos, y si se prueba su importancia deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos para garantizar su disponibilidad. El objetivo primario para la concepción de una colección de cultivos microbianos es mantener las cepas en un estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos. Con el desarrollo de la biotecnología y la bioingeniería el mantenimiento de esta estabilidad y viabilidad adquiere mayor importancia (Smith, y Onions, 1994). Las colecciones de cultivos microbianos están representadas internacionalmente por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC). Actualmente existen 469 colecciones de 61 países registradas en el Centro Mundial de Datos de Microorganismos, en Riken, Japón (WDCM, 2002). La interacción y colaboración entre las colecciones está creciendo rápidamente, gracias al establecimiento de organizaciones mundiales, regionales y nacionales que con sus múltiples actividades contribuyen al desarrollo de las mismas. En Cuba, las colecciones de cultivos microbianos se han establecido en más de 35 Instituciones del país. Desde finales de 1995 comenzó a organizarse el Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos como vehículo ideal para facilitar los estudios de biodiversidad, definir nuevas líneas de trabajo y aplicar a niveles microbianos los acuerdos de la Convención de la Diversidad Biológica (Pérez, 1997). El CENSA forma parte de este Grupo y cuenta con un gran número de especies que han servido para el desarrollo de las investigaciones y en los últimos años al desarrollo, evaluación y control de productos. Desde 1992 con la creación del departamento de Aseguramiento de Calidad se hizo necesario organizar una colección con los microorganismos que forman parte de los productos biológicos que se fabrican en el centro y de otro grupo de microorganismos utilizados como controles de diferentes ensayos de evaluación de estos productos. Dentro de las Buenas Prácticas este es uno de los aspectos que se exige para la fabricación de productos de origen microbiano (CECMED, 2006), por lo que contar con una colección adecuada es parte de la eficacia y seguridad de nuestros productos, investigaciones y servicios científico técnicos. Los procedimientos seguidos por una colección de cultivos deben garantizar la calidad del producto de manera que los resultados puedan ser reproducibles, por lo que se deben aplicar medidas de aseguramiento y control de la calidad. En 1996, Smith, establece los aspectos esenciales que debe abarcar una norma para las colecciones de cultivos microbianos, y son: identificación adecuada de las cepas; Pureza; Viabilidad, uso de Metodologías documentadas, auditorías; cumplimiento de las legislaciones, y otros. Además de esto existen normas internacionales reconocidas como las ISO 9001 y esquemas de acreditación de laboratorio, que a pesar de no ser específicas para las colecciones, también pueden aplicarse.

## 2.1. Las colecciones de cultivos microbianos

Los microorganismos son los seres vivos más antiguos del planeta, se encuentran prácticamente en cada nicho sobre la tierra mostrando una gran diversidad morfológica, ecológica, fisiológica y molecular. Sin la actividad microbiológica, sería imposible la vida en la tierra, pues la diversidad de los microorganismos juega un papel clave en el mantenimiento de la biosfera y proporciona un vasto e inexplorado recurso para la humanidad. Su número total se desconoce y los estudios *in situ* son muy difíciles (Stackebrandt, 1994).

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente (Llop, *et al.*; 1998). Ellos son la fuente del material básico para el desarrollo de medicamentos farmacéuticos, agentes agroquímicos y biocontroles, cosméticos y productos industriales (ten Kate, 1995).

Los microorganismos que son aislados desde su ambiente natural son típicamente conservados en colecciones de cultivos. El número así mantenidos son la base del conocimiento actual de la diversidad microbiana y constituirán el material de trabajo para estudios futuros. Ellos son un inestimable recurso genético, que forman una pequeña parte dentro del inmenso número de microorganismos que no están descritos en la actualidad.

Los objetivos del trabajo científico con microorganismos pueden ser variados, y pueden incluir investigaciones medioambientales, taxonómicas, de la agricultura y biomédicas, así como la búsqueda de nuevos productos que puedan tener valor comercial.

La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la ciencia. La ambigüedad asociada al reislamiento subraya la necesidad de hacer depósitos de microorganismos en una colección de cultivos, que proporcione servicio de conservación experimentada, rápido acceso y la provisión de una cepa de referencia única y conservada. Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio.

La inclusión de los microorganismos en la Convención de Diversidad Biológica (CDB) reconoce el papel fundamental que juega la diversidad microbiana. A pesar de esto hay muchos artículos de la convención que han creado polémica entre los microbiólogos, y esto ha motivado el desarrollo de algunos artículos científicos con la intención de favorecer la interpretación y así el cumplimiento de los objetivos de la CDB. En este sentido, en septiembre de 1996, la WFCC publicó un documento informativo dirigido a los gobiernos, los cuerpos legales de los diferentes países y los microbiólogos, sobre temas relacionados al acceso a los recursos genéticos microbiológicos *ex situ* tratado en la CDB. Smith, en el 2000, propuso una pequeña guía que contiene los requisitos mínimos que deben tenerse en cuenta por las colecciones con el objetivo de determinar las acciones necesarias para cumplir con la Convención. En este mismo artículo el autor plantea que

existe un grupo de problemas que aún no están resueltos y que afectan el cumplimiento de la CDB, relacionados con los derechos de la propiedad intelectual; la necesidad de establecer un enfoque claro, sencillo, y flexible; los procedimientos de seguimiento y ejecución; y otros.

Las colecciones de cultivos tienen la tarea de custodiar los recursos genéticos *ex situ*, constituyendo el mecanismo por el cual se asegura la diversidad microbiana, pues juegan un papel clave en la conservación de recursos genéticamente estables (Kirsop and Hawksworth, 1994). De esta manera se puede disponer de recursos microbianos mantenidos y preservados según los intereses de la comunidad científica.

Las colecciones de cultivos microbianos tienen funciones básicas como son: la conservación *ex situ* de organismos, custodiar recursos nacionales, suministro de recursos viables como base para el desarrollo de la ciencia, recibir depósitos sujetos a publicación y ofrecer servicios de depósito seguros y confidenciales (Smith, 2000). Además, pueden prestar servicios de identificación, de referencia taxonómica, de información y consultas profesionales, de entrenamientos e instrucción y apoyo especializado en innumerables áreas, realizar programas de investigación y establecer bases de datos y redes de información (Kirsop, 1991).

A pesar de la importancia de las colecciones de cultivos microbianos, muchas de ellas están en peligro por la ausencia de fuentes de financiamiento y un inadecuado apoyo científico-técnico (Yamasato, 1992). Estos aspectos fueron analizados durante el 7mo Congreso de colecciones de cultivos microbianos y de ellos se derivaron algunos acuerdos referidos al apoyo financiero necesario para el logro de los objetivos allí planteados. Además, en el 8vo Congreso se reflejó la necesidad de un compromiso a largo plazo con los gobiernos para apoyar la conservación de toda la biodiversidad microbiana y lograr el progreso científico y la inclusión de este tema en el desarrollo de las políticas ambientales, con el objetivo de poder implementar los principales objetivos de la CDB.

## **2.2 Historia y Actualidad**

El surgimiento de los medios de cultivos sólidos para el crecimiento de los microorganismos, y el éxito de los primeros aislamientos de cultivos puros, marcaron la necesidad de preservarlos para el futuro. La primera colección de cultivos microbianos se estableció en 1880 en Praga, Viena, por Frántisek Král, quién tuvo una visión de la importancia que las colecciones de cultivos tendrían para el desarrollo de la ciencia. Se conoce que en este período también se establecieron otras colecciones de cultivos en los principales institutos de París, Berlín, Londres y Japón, pero la información al respecto es escasa. En 1890 Král publicó el primer catálogo de cultivos microbianos, y esta colección se mantuvo durante 21 años. Actualmente algunos de los materiales que formaron parte de ella se conservan en el museo de Historia Natural de Viena.

Según Porter, 1976, la otra colección más antigua fue creada en 1906 por la Asociación Internacional de Botánicos, en Baarn, Holanda. En 1919, se estableció la colección del Commonwealth Mycological Institute del Reino Unido, y en 1925 la de Estados Unidos (American

Type Culture Collection (ATCC)). Estas colecciones son internacionalmente reconocidas y mantienen millones de cepas microbianas, algunas de ellas patentadas para procesos biotecnológicos.

El número de colecciones de cultivos se ha incrementado y actualmente existen 469 colecciones en 61 países registrados en el Centro de Datos Mundial de Microorganismos (WDCM). Estas pueden ser estatales, semi-gubernamentales, sustentadas por universidades o industrias, o privadas; y pueden especializarse en las ramas: agrícola, forestal, marina, médica, veterinaria, industrial y otros (WDCM, 2002). Sin embargo existen muchas otras colecciones establecidas y que no están registradas en la WDCM.

El establecimiento de organizaciones mundiales, regionales y nacionales ha favorecido la interacción y colaboración entre las colecciones (Malik, 1992, Hawksworth y Aguirre-Hudson, 1994). La máxima organización que representa las colecciones de cultivos es la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), fundada en 1963. Esta es una federación de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) y una comisión de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (IUBS), y tiene la responsabilidad de promover y propiciar el desarrollo de las colecciones de cultivos de microorganismos y cultivos de células (Kirsop, 1990).

En Cuba, a fines de la década del 70 y principio de la década del 80, la entonces Academia de Ciencia de Cuba (ACC), decidió comenzar la organización del Cepario Nacional para localizar e inventariar las colecciones de interés sanitario, agrícola e industrial existentes en el país. En 1987 se hizo otro intento, y en esta ocasión se determinó que la ACC debería ser el centro coordinador nacional sobre colecciones de microorganismos, células, plásmidos, genes e hibridomas, y se trazaron varios objetivos de trabajo. En esta ocasión no todos los centros involucrados colaboraron con esta actividad y por tanto se dieron pasos lentos. Es en 1992 que se presenta y aprueba en el Frente Biológico un Anteproyecto de Reglamento para las colecciones de cultivos cubanas, donde se regulan las funciones fundamentales de las colecciones cubanas: a) Preservar y mantener controladamente los patrones fenotípicos y genotípicos que caracterizaron el material inicial con un valor de referencia y b) Garantizar que la función biológica generada o rescatada en el transcurso de la manipulación original o posterior pueda mantenerse indefinidamente. Además, se define, entre otros aspectos, que la colección cubana será descentralizada, de acuerdo con las pautas trazadas por la WFCC.

En 1995 surgió el Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos para estimular el desarrollo y organización nacional de las colecciones de microorganismos y otros materiales biológicos en el país. El grupo cuenta con un Comité Gestor y representantes de más de 37 instituciones del país, se trazan objetivos a corto y largo plazo, se realizan reuniones trimestrales y cada año se desarrolla al menos una actividad de superación para los miembros.

En 1998, como propuesta del Grupo Nacional, se inició el proyecto "Centro de Información para Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos", a través del cual se creó la base de datos de las Colecciones de Cultivos de Cuba. Otro de los objetivos del Grupo fue lograr su oficialización, meta

alcanzada en el año 2002 después de muchos intentos infructuosos. Actualmente el Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos de Cuba constituye una Sección de trabajo dentro de la Asociación de Técnicos y Azucareros de Cuba (ATAC), sociedad no gubernamental con gran reconocimiento nacional e internacional y la más antigua del país.

### **2.3- Establecimiento y Operación de las colecciones de cultivos microbianos**

En la última década 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 biotecnológico mundial. Por estas razones muchos países han apoyado el establecimiento de colecciones de cultivos que brinden servicios en su país o en la región y que desarrollen sus propios programas de investigación.

A pesar de existir diversas publicaciones que proponían técnicas y procedimientos; de que algunos países habían publicado guías nacionales y regionales; internacionalmente no existía ningún documento que brindara los aspectos mínimos que debían regir el trabajo de las colecciones de cultivos. Para dar solución a esta situación la WFCC desarrolló, en 1990, los Lineamientos para el Establecimiento y Operación de las Colecciones de Cultivos Microbianos, cuyos principios pueden ser aplicados a cualquier colección de cultivos independientemente de su tamaño y su poder adquisitivo.

Este documento describe los propósitos de las colecciones de cultivos; los servicios que éstas pueden brindar a la comunidad científica en cuanto a recursos, información y personal especializado; la necesidad de contar con instalaciones apropiadas, la cantidad de personal adecuado y de alto nivel profesional, que garanticen el apoyo necesario a largo plazo para brindar estos servicios; las contribuciones hechas por las colecciones a la investigaciones básicas sobre estudios taxonómicos, procedimientos de preservación, cultivo y manipulación de microorganismos; la capacidad de las colecciones de conocer todas las regulaciones de control, transportación y seguridad durante la distribución y manipulación de los recursos genéticos; la necesidad de brindar apoyo y entrenamiento a otras colecciones; y la necesidad de la colaboración internacional para incrementar el valor y calidad de los recursos biológicos (WFCC, 1999). Por la importancia que representa este documento para el establecimiento y operación de las colecciones de cultivos microbianos, a continuación hacemos un resumen de los principales aspectos que se deben tener en cuenta para el cumplimiento de esta guía internacional.

#### **2.3.1 Organización**

La organización de la cual forma parte la colección de cultivos debe aceptar y estar completamente consciente de las responsabilidades inherentes al mantenimiento de una colección de cultivos. El compromiso de mantener la colección y sus servicios (según proceda) a largo plazo debe estar incluido en los planes estratégicos o en los objetivos de la organización (WFCC, 1999).

### **2.3.2 Financiamiento**

La administración y el financiamiento de las colecciones de cultivos requieren de un compromiso a largo plazo por parte de la organización de la cual forma parte la colección de cultivos. El apoyo solo a corto plazo es inapropiado para las colecciones de servicios que proveen servicios de suministro y almacenamiento por largos períodos de tiempo como parte de la infraestructura que sustenta las ciencias biológicas. Es importante considerar el nivel de financiamiento actual y futuro, lo cual puede ser adecuado para brindar todos los servicios planificados incluyendo algunos clientes que soliciten el servicio fuera de lo planificado. Si los recursos son limitados, es preferible limitarse al cumplimiento de los objetivos primarios de la colección (WFCC, 1999).

### **2.3.3 Objetivos**

Las colecciones requieren de una declaración general y concreta de sus objetivos a largo plazo de acuerdo con su capacidad de respuesta y considerando los servicios externos que potencialmente pueden brindar. Además, puede ser favorable para una colección de cultivos tener objetivos específicos a corto plazo considerando períodos de un año, tres o cinco años. Estos pueden incluir el número y grupo de cepas que se ha planificado adquirir en ese período, y el cronograma para la instalación de nuevas habitaciones o equipos. Donde sea factible se debe declarar una misión en concordancia con los objetivos de la colección (WFCC, 1999).

### **2.3.4 Recursos biológicos (valores habidos de la colección)**

La extensión del material y número de cepas que se tendrán requiere una cuidadosa estimación y conciliación con la organización de la cual forma parte la colección, teniendo en cuenta los recursos financieros disponibles. Además, es necesario tener claramente definida una política de entrada para la aceptación de nuevas cepas en la colección. Si esto no está definido y se aceptan muchas cepas que no han sido solicitadas sin tener en consideración los objetivos fundamentales de la colección, se pueden ver afectados la capacidad de almacenamiento, el personal y los recursos financieros de la colección. Se debe adoptar una política que balancee la capacidad de la colección con respecto a las necesidades de la ciencia (WFCC, 1999).

Las cepas mantenidas que son potencialmente patógenas al hombre, animales o plantas, o producen compuestos tóxicos o alucinógenos, deben estar claramente identificadas y mantenidas en condiciones de seguridad. Es obligatorio el cumplimiento de las regulaciones de control y seguridad; institucionales, nacionales o internacionales (Smith, 2000; WFCC, 1999).

Las colecciones pueden variar sustancialmente la extensión de los grupos de microorganismos mantenidos por varias razones, entre ellas, por orientación de sus clientes; por tanto esto debe considerarse en las etapas iniciales de planificación de los recursos (WFCC, 1999).

Es económicamente prudente contar con cepas que no están disponibles en otras colecciones de cultivos. Para muchas colecciones es importante contar con cepas de referencia internacionalmente reconocidas, sin embargo, la WFCC aspira a disminuir la tendencia que existe



de mantener material duplicado en muchas colecciones, pues esto representa un gasto innecesario de los escasos recursos disponibles. Siempre que sea factible, las nuevas colecciones de microorganismos deben reflejar la diversidad de recursos genéticos microbianos más que duplicar los que ya existen. Sin embargo en muchos países el costo del transporte marítimo de las cepas desde otras colecciones está prohibido y entonces se hace necesario la duplicación de algún material. La comunidad de colecciones de cultivos tiene una historia en la distribución de cepas de importancia científica y la WFCC espera que esta cultura se mantenga por el bien la ciencia (WFCC, 1999).

### **2.3.5 Personal**

Las colecciones de cultivos tienen una labor intensiva y esto incluye la preservación, mantenimiento, documentación y los chequeos de viabilidad de rutina. Es necesario contar con la cantidad de personal suficiente no solo para la incorporación de nuevos cultivos y su mantenimiento, sino también para cumplir el nivel suministros de cultivos y otros servicios que brinda la colección. La conservación y mantenimiento efectivos en una colección de cultivos es fundamental y esto requiere de conocimientos de los organismos, su crecimiento y requisitos de preservación, propiedades y aplicaciones potenciales. El personal clave debe estar altamente calificado y tener experiencia directa o entrenamiento especializado en el manejo de una colección de cultivos. La designación de especialistas en identificación y autenticación de todos los grupos de microorganismos mantenidos y con algunas habilidades sobre taxonomía, es esencial para el control de la calidad de la colección de cultivos. Cuando se requiera apoyo adicional con especialistas en taxonomía se deben establecer vínculos de colaboración (WFCC, 1999).

### **2.3.6 Preservación**

Los microorganismos a menudo requieren de métodos de preservación especiales para asegurar su óptima viabilidad, almacenamiento, pureza y estabilidad. Para mayor seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de cepas, cada cepa debe ser mantenida al menos por dos procedimientos diferentes, siempre que sea factible. Como mínimo uno de ellos debe ser la liofilización o la criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido), pues estos son los mejores métodos para la minimización de los riesgos de cambios genéticos para la mayoría de las cepas. En algunos casos (líneas celulares) donde solo es aplicable la congelación, debe conservarse el material duplicado en refrigeradores separados con diferente alimentación eléctrica o en contenedores de nitrógeno líquido separados (WFCC, 1999).

Para muchos grupos de microorganismos existe adecuada experiencia sobre los métodos óptimos de preservación, sin embargo esto no es así para todos los microorganismos, y generalmente en estos casos es necesario desarrollar investigaciones para determinar el protocolo de preservación óptima. Para minimizar los riesgos de importantes cambios genéticos producto de condiciones adversas, como pueden ser: fuego, inundaciones, terremotos, guerras u otras catástrofes, las

colecciones deben tener réplicas de las cepas más importantes y su adecuada documentación en lugares separados (WFCC, 1999).

### **2.3.7 Procedimiento para el depósito y autenticación del cultivo**

Los científicos obtienen el material de investigación de colecciones de cultivos reconocidas pues en ellas este material está sometido a control de la calidad y pruebas de autenticación como parte de los procedimientos rutinarios de la colecciones. El uso incorrecto de organismos en investigaciones implica una pérdida de tiempo, de recursos y conlleva a la invalidación de los resultados publicados. Además, sin la adecuada autenticación los organismos nocivos podrían suministrarse inadvertidamente. Esto genera una gran responsabilidad sobre las colecciones y demanda la atención desde el momento en que se recibe el cultivo para su preservación. (WFCC, 1999).

Como parte de los procedimientos para el depósito, las colecciones deben brindar registros de entrada para ser llenados por los clientes o depositores (persona que deposita una cepa en la colección). El registro debe incluir toda la información relativa a la cepa y su origen (país de origen, nombre del que hizo el aislamiento, fecha/hora/localización geográfica del aislamiento, identificación taxonómica (si se conoce), propiedades fenotípicas y genotípicas, referencias bibliográficas, y restricciones de distribución conocidas). Esta información es importante para brindar la mayor cantidad de datos científicos a los futuros usuarios, y además, para cumplir con los acuerdos de la Convención sobre Diversidad Biológica (WFCC, 1999).

Cuando los cultivos son recibidos, se debe registrar el nombre de la persona que realizó la identificación original. La colección debe confirmar, con un especialista competente, esta identificación y chequear que concuerda con las descripciones publicadas de la especie. Todo el material que entra debe ser tratado como potencialmente peligroso hasta tanto no se haya confirmado su identificación. Deben existir procedimientos para asegurar que el material no identificado no será tratado casualmente y que se cumplen todos los requisitos de seguridad. En caso de recibir cultivos desconocidos, la colección debe tener cuidado con la identificación del material en los grupos taxonómicos para los cuales no existen especialistas expertos y debe esforzarse por tener el material chequeado por especialistas antes de su incorporación (WFCC, 1999).

En el caso de los cultivos que son reconocibles desde preparaciones microscópicas o cultivos secos (ej: hongos filamentosos, algas, protozoos), una buena práctica es realizar estas preparaciones cuando éstos son recibidos para el depósito. Esto facilita chequear si una cepa recobrada a partir del material preservado durante el mantenimiento o en los trabajos de re-preservación de rutina, está en correspondencia con la depositada originalmente. Este chequeo puede incluir realización de pruebas, estudios comparativos, o chequeo por un especialista. También se recomienda conservar dibujos o imágenes fotográficas, donde sea factible (WFCC, 1999).

### **2.3.8 Suministro de cultivos**

Si una colección de cultivos ha sido establecida para brindar un servicio público, entonces debe tener la capacidad de brindar oportunamente las cepas que se soliciten. Si no se pueden entregar los cultivos en un tiempo razonable por razones científicas o técnicas (ej: si el crecimiento de la cepa es muy lento), esto debe estar indicado en catálogos, listas o bases de datos (si los poseen). Los costos de los cultivos varían en dependencia de las bases de financiamiento y políticas de los administradores de la colección (en los casos que proceda). Muchas colecciones intercambian cultivos con otras colecciones de servicio sin costo alguno. Los cultivos para propósitos de adiestramiento e investigación generalmente tienen un costo reducido (WFCC, 1999).

Los cultivos listados como disponibles en los catálogos deben ser brindados por las colecciones de servicio sin restricciones. En el caso de los que no están disponibles para su distribución, no deben aparecer en los catálogos ni estar incluidos en las bases de datos; y aquellos con distribución restringida deben estar claramente identificados (WFCC, 1999).

Las cepas patógenas o tóxicas al hombre, animales o plantas generalmente están sujetas a regulaciones nacionales o internacionales. Los científicos que necesitan estas cepas deben obtener un permiso para importar el material o para la manipulación de los cultivos. Cuando los cultivos sujetos a estas regulaciones son suministrados a una persona o institución desconocidas para la colección, deben mantenerse certificados de garantía firmados por la persona que hace la solicitud y el experto de la institución antes de despachar el cultivo. Las colecciones deben mantener registros detallados de los cultivos distribuidos (con la cepa y número de lotes cuando sea apropiado), especificando el procedimiento y fecha de envío, y nombre y dirección de la persona a la que se le envió. Cuando el envío se realiza a través del correo, deben tenerse en cuenta las regulaciones postales respecto al etiquetado y embalaje (WFCC, 1999).

### **2.3.9 Promoción y publicidad**

Las colecciones deben lograr una amplia publicidad de sus recursos y servicios que prestan a la comunidad científica. Esto puede lograrse con la distribución de folletos, participación en talleres y conferencias, publicación de artículos, desarrollo de páginas Web sobre la Internet donde se publiquen catálogos, datos de las cepas, servicios que prestan. Además, la colaboración con organizaciones nacionales o regionales puede ser beneficiosa para este fin (WFCC, 1999).

### **2.3.10 Otros servicios**

Las colecciones de cultivos de servicios pueden brindar una variedad de servicios de apoyo a la comunidad científica e industrial regional o mundial. Si ofrecen servicios de identificación debe garantizarse el adecuado entrenamiento al personal. Si brindan servicios de depósito de patentes, deben operar de acuerdo con los procedimientos acordados en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos de Patentes. Si

ofrecen servicios de investigación o consultoría deben contar con las instalaciones apropiadas y el personal adecuadamente entrenado (WFCC, 1999).

### **2.3.11 Documentación**

Se necesitan mantener registros para cada cepa mantenida y estos deben incluir la siguiente información: localización geográfica, sustrato u hospedero, fecha de aislamiento, nombre de la persona que realizó el aislamiento de la cepa, depositar (u otra fuente de la cepa, ej: otra colección), nombre de la persona que realizó la identificación de la cepa, procedimiento de preservación utilizado, temperatura y medio óptimo para el crecimiento, características bioquímicas u otras, y alguna condición regulatoria aplicable (relacionada por ejemplo a la cuarentena, nivel de contención o seguridad, patente). Si los recursos lo permiten los registros deben ser computarizados. Es posible distribuir esta información a través de la Internet. Para mayor seguridad se deben mantener copia dura y/o blanda de los archivos computarizados. En estos casos el personal de la colección debe estar familiarizado con la operación del sistema computarizado, para garantizar la continuidad el servicio (WFCC, 1999).

### **2.3.12 Catálogos**

Se deben reproducir a intervalos regulares (cada cinco o más años) los catálogos de las cepas disponibles. Estos pueden ser computarizados y distribuidos a través de internet, o en disquetes o en CD-ROM, lo cual contribuye a la publicidad de la información mantenida por la colección (WFCC, 1999).

### **2.3.13 Investigaciones**

Como centro de expertos, los programas de investigación deben formar parte de cada actividad de la colección, a través de lo cual se pueden hacer importantes contribuciones al conocimiento de la morfología, taxonomía, fisiología, bioquímica, y genética de los grupos de organismos mantenidos. Las actividades de investigación también aseguran que el personal se mantenga actualizado sobre el desarrollo de la ciencia y esté consciente de las necesidades de la comunidad científica. Las colecciones desarrollan estrategias y procedimientos para el aislamiento e identificación de organismos particulares o productos, pruebas de control de la calidad, protocolos de preservación para cepas difíciles de preservar por procedimientos de rutina, así como desarrollan medios de cultivos y condiciones de crecimiento óptimos (WFCC, 1999).

### **2.3.14 Entrenamiento**

El personal que trabaja en una colección de cultivos debe estar adecuadamente entrenado, y cuando adquiere suficiente experiencia éste debe entrenar a otras personas en técnicas de preservación, crecimiento e identificación de cultivos. Si brindan entrenamiento es importante

asegurar los locales adecuados, así como la supervisión del personal en entrenamiento velando pro el cumplimiento de las medidas de seguridad (WFCC, 1999).

### **2.3.15 Normas de seguridad y calidad**

Los aspectos de seguridad de todas las operaciones llevadas a cabo en la colección necesitan ser cuidadosamente controlados, teniendo en cuenta las regulaciones nacionales de seguridad y salud (sobretudo con las cepas potencialmente patógenas al hombre, animales o plantas); y las buenas prácticas de laboratorio. Se requieren locales para la apertura segura de paquetes que contienen nuevos depósitos o material para identificación que puede contener organismos nocivos. Las colecciones pueden valorar la utilización de normas de calidad internacionalmente reconocidas (ej: ISO 9001) lo cual indica un nivel garantizado de calidad (WFCC, 1999).

### **2.3.16 Colaboración nacional e internacional**

Las colecciones de cultivos deben motivarse a contactar con la WFCC. Esta organización tiene comisiones que se encargan de enseñanza; patentes; regulaciones de seguridad, postales y de cuarentena; colecciones en peligro; biodiversidad y publicidad; los cuales brindan información útil para las colecciones nuevas y para las ya establecidas. Esta organización desarrolla congresos internacionales cada cuatro años, y este es el único forum para la consideración de todos los aspectos de la actividad de las colecciones de cultivos. Se publica un boletín informativo con la planificación de entrenamientos y cursos que se brindan. Muchos países tienen asociaciones o federaciones de colecciones formales o informales, lo cual es el marco adecuado para el intercambio de información y de discusión de los problemas comunes. En este sentido también debe ser propiciado el intercambio formal o informal con grupos activos regionales. Con el objetivo de dar a conocer los recursos contenidos en la colección, ésta debe motivarse a registrarse en la WDCM (WFCC, 1999).

Todos los aspectos relacionados en este acápite 2.3 se deben tener cuenta para el establecimiento y operación de las colecciones de cultivos. Es posible que en nuestro país algunos términos no se ajusten, pero la esencia del documento puede ser adoptada por cualquier tipo de colección. Sin embargo las colecciones no deben limitarse solo a esto, por ejemplo, en el documento se habla de la necesidad del cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, de las regulaciones de seguridad existentes; de la documentación mínima necesaria para la operación de una colección; de valorar el establecimiento de un sistema de gestión de la calidad según las normas ISO 9000; pero no se refleja la necesidad imperiosa de implementar un programa o sistema de aseguramiento de calidad en una colección de cultivos como garantía de todas las operaciones realizadas en ellas. Estos aspectos son tratados en el acápite 2.5 del presente documento, y a continuación se profundiza en los aspectos de preservación de cultivos microbianos dentro de una colección de cultivos.

## **2.4- Preservación de cultivos microbianos**

Los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos microbiológicos. Los cultivos de referencia o controles son utilizados en un amplio número de determinaciones, debido a que no pueden obtenerse resultados válidos si no se trabaja con cultivos de alta calidad. Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio (Sly, 1992).

Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables. Para lograr estas condiciones se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos lo más cercano posible al aislamiento original. La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (Sly, L.; 1992).

Todos los métodos de preservación tienen ventajas y desventajas por tanto es necesario hacer una selección del método a utilizar haciendo un análisis de las características de cada técnica, factibilidad de su uso y las necesidades del usuario (Snell, 1991 y Smith, 1996). Generalmente la elección depende de la disponibilidad del equipamiento y de la competencia del personal, y es recomendable utilizar más de un método de preservación y trabajar con réplicas del microorganismo que se desea preservar como medida de seguridad (Sly, L.; 1992).

Los métodos desarrollados para la preservación de los microorganismos se pueden clasificar en: subcultivos, desecación, liofilización y congelación (Snell, 1991); y estos últimos son los de mayor éxito pues garantizan la preservación por períodos muy prolongados.

### **2.4.1- Subcultivos**

El método tradicional para la preservación de los microorganismos es el subcultivo y consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo (Snell, 1991). Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años. Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador a 4<sup>o</sup>C o en un freezer entre -10<sup>o</sup>C y -20<sup>o</sup>C, bajo aceite mineral o agua (Smith y Onions, 1994).

Este método es muy simple, con él se puede mantener la viabilidad de algunos microorganismos por muchos años, y la recuperación de los cultivos activos es relativamente fácil. En el caso de colecciones pequeñas, éste puede ser un método económicamente factible en cuanto al equipamiento y al tiempo que se invierte. Actualmente algunas colecciones de cultivos lo utilizan para la preservación de sus microorganismos, como es el caso del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (Rodríguez *et al.*, 1996).

Sin embargo tiene algunas desventajas como son, la posibilidad de la pérdida de la identificación del microorganismo después de muchas transferencias de nombres o designaciones de los cultivos; el riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias; la posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas; el peligro de pérdida del cultivo sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y no se realizan transferencias periódicas oportunas a medios frescos; la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo; además, cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento (Smith y Onions, 1994).

#### **2.4.2- Deseccación**

El método de almacenamiento de microorganismos en estado de secado ha sido aplicado como un método de preservación particularmente para bacterias y hongos que consiste en la separación del agua y la prevención de la rehidratación. Para el desarrollo de los métodos de desecación se han empleado arena, tierra y zeolita (Heidrich *et al.*, 1996); sílica gel (Sidyakina, 1991); discos y tiras de papel (Kirsop, 1991); tapones de algodón (Malik, 1991); discos de gelatina (Snell y Kocur, 1991) y cuentas de vidrio y de porcelana (Malik, 1991).

La desecación es un método simple para la preservación de microorganismos, el trabajo no es muy intenso, el costo es pequeño y la contaminación de los subcultivos es menos probable que con los subcultivos periódicos. Además, puede utilizarse para el almacenamiento de un gran número de cultivos. A pesar de esto, resulta difícil evaluar detalladamente su confiabilidad, pues, en la mayoría de los casos, la información apropiada no está disponible y en otros está restringida a un número limitado de microorganismos. De cualquier modo, los cultivos no deben ser preservados solamente por este método sin una investigación previa (Malik, 1991).

#### **2.4.3- Liofilización**

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada (ATCC, 1991).

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, la concentración de los microorganismos, entre otros.

El medio de preservación es esencial para proteger las células de los daños producto de los procesos de congelación y sobresecado. La elección del medio depende del microorganismo de manera que se logre mantener la viabilidad y permitir un buen recobrado posterior al proceso de

liofilización. Usualmente el medio de preservación contiene altos niveles de suero, proteínas, aminoácidos (ej: glutamato monosódico), carbohidratos (ej: glucosa, sacarosa) o leche descremada (Sly, L. 1992).

Este método es uno de los más eficaces para la conservación de muchos tipos de microorganismos, como: bacterias, hongos, bacteriófagos y virus; algunos de ellos pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años (ATCC, 1991; Sly, 1992). Es conveniente para la producción y distribución masiva de cultivos, la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos se mantienen por largos períodos de tiempo, no se requiere de una atención constante después de almacenarse los cultivos liofilizados y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio (Snell, 1991). Malik en 1995 reportó un método miniaturizado de liofilización utilizando capilares de vidrio mediante el cual se reduce el espacio de almacenamiento y el costo de la distribución de los cultivos. Sin embargo, el proceso es complejo y caro, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío (Smith y Onions, 1994), por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados.

#### **2.4.4- Congelación**

La preservación por congelación o criopreservación consiste en la congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas. En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser de  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$ , y temperaturas de nitrógeno (fase de vapor:  $-140^{\circ}\text{C}$ ; fase líquida:  $-196^{\circ}\text{C}$ ). La temperatura de almacenamiento seleccionada depende de las facilidades disponibles, pero las temperaturas más bajas favorecen la viabilidad y la estabilidad genética (Sly, L. 1992).

La mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos, virus, bacteriófagos) sobreviven largos períodos el almacenamiento en estado de congelación por la reducción marcada de su ritmo metabólico. Algunos protozoos, algas y células humanas también pueden ser preservados por este método (Sly, L. 1992). Existen muchos factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, por lo que deben realizarse pruebas de ajustes del grado de enfriamiento y calentamiento, además de la adición de crioprotectores a la suspensión celular (Snell, 1991). Los aditivos crioprotectores son compuestos químicos de gran afinidad por el agua y son utilizados para disminuir los daños durante el proceso de congelación, ejemplo de ellos son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) (ATCC, 1991).

El almacenamiento de microorganismos por el método de congelación a temperaturas extremadamente bajas es muy simple y se ha logrado estandarizar para la preservación de un amplio rango de microorganismos. Con él se obtiene la más reducida pérdida de viabilidad, un alto grado de estabilidad y períodos de sobrevivencia de más de 30 años. El costo inicial del equipamiento puede ser alto pero la seguridad de este método justifica su costo, sobretodo en cultivos difíciles de preservar por otros métodos (Sly, L. 1992). Sin embargo, el nivel de nitrógeno líquido de los contenedores debe chequearse diariamente y mantenerse constante; la distribución



de los cultivos congelados se hace difícil y costosa; y la penetración de nitrógeno líquido en ampulas mal selladas puede provocar explosiones cuando se trasladen del contenedor a otro lugar, por lo que se recomienda utilizar recipientes de plástico o almacenamiento en la fase de vapor del nitrógeno. Cuando se utiliza este método debe utilizarse protector para la cara, bata y guantes de laboratorio como medidas de seguridad contra las salpicaduras y derrames de nitrógeno líquido y la explosión de las ampulas de vidrio (Kirsop, 1991; Sly, L. 1992).

## **2.5- Aseguramiento de la calidad para las colecciones de cultivos**

Es muy importante que los organismos de uso biotecnológico sean mantenidos en una forma que permita conservar sus propiedades. Los procedimientos seguidos por las colecciones de recursos microbianos deben asegurar la calidad del producto brindando materiales de referencia que permitan obtener resultados reproducibles. Las colecciones deben aplicar el control de la calidad y medidas de aseguramiento para mantener esas condiciones teniendo en cuenta las necesidades de los usuarios y la disponibilidad de los recursos.

Existen un gran número de modelos nacionales e internacionales para los Sistemas de Aseguramiento de Calidad que pueden ser utilizadas por las colecciones de cultivos, entre ellas están las ISO 9000 y las normas para la acreditación. No existe un Sistema de Acreditación diseñado particularmente para colecciones de cultivos pero los anteriormente mencionados pueden ser aplicados (Day, 1998).

Stevenson y Jong (1992) reportaron la necesidad de controlar la calidad y normalizar el trabajo de las colecciones de cultivo, para incrementar la calidad de las colecciones y de esta manera asegurar que se ofrece el servicio que se requiere para la ciencia e industria, garantizando materiales de referencia estables para el futuro.

En el mundo existen algunas normas generales para las colecciones, como por ejemplo, los lineamientos de la WFCC para el establecimiento y operación de las colecciones de microorganismos (Hawksworth *et al.*, 1990); el proyecto de normas para las colecciones miembros de la red de información microbiana para Europa (MINE) (Hawksworth y Schipper, 1989); y las normas para bancos de germoplasmas. Organización de alimentos y agricultura de Naciones Unidas, Roma, Instituto de Recursos Genéticos de Plantas Internacional, Roma (Anon, 1994). En el caso de los laboratorios de microbiología existen un grupo de normas más específicas como las de Buenas Prácticas de Laboratorio, las normas británicas 5750, los servicios nacionales de medición (NAMAS). A pesar de que existen publicaciones sobre el mantenimiento de las colecciones de cultivo que brindan información a través de protocolos y procedimientos, es necesario elaborar y establecer normas (Hawksworth y Kirsop, 1988; Kirsop y Kurtzman, 1988; Kirsop y Doyle, 1991; Smith y Onions, 1994), pues no existe ningún esquema de acreditación diseñado específicamente para las colecciones de cultivos.

En 1993 la Comisión de Recursos Genéticos de Plantas emitió las normas para los bancos de genes, que pueden ser usadas como referencia regional, nacional e internacional (Anon, 1994).

Estas normas abarcan solamente el almacenamiento de semillas auténticas que pueden sobrevivir a la desecación, y cuya longevidad de la semilla es mejorada con la reducción de la humedad y la temperatura de almacenamiento. Las colecciones de recursos microbianos pueden beneficiarse con la aplicación de normas similares (Smith, 1996 y Day, 1998).

Algunas colecciones de cultivos de cultivos microbianos trabajan en el establecimiento de un sistema de aseguramiento de calidad para garantizar confianza a sus clientes en el servicio brindado, y así mismo desarrollan manuales de procedimientos de laboratorio como reflejo de esos sistemas de calidad, como es el caso de la Colección de Cultivos Nacional del Reino Unido (UKNCC) (Day, 1998).

Los siguientes requisitos aparecen contenidos en todas las normas revisadas, y deben constituir los requisitos mínimos para el aseguramiento de calidad de las colecciones de cultivos:

- Documentación
- Identificación y autenticidad de las cepas
- Pureza
- Monitoreo de viabilidad
- Estabilidad de las propiedades de las cepas
- Estandarización de las condiciones de crecimiento
- Metodologías y protocolos de preservación estandarizados
- Mantenimiento de los equipos
- Normas para el suministro e intercambio de cepas
- Seguridad a largo plazo
- Control de las condiciones ambientales
- Auditorías
- Cumplimiento de las legislaciones
- Personal y entrenamiento

### **2.5.1- Documentación**

Un aspecto fundamental para llevar cabo un riguroso control de calidad en una colección de cultivos es contar con sistema de documentación eficiente. Las colecciones de cultivos reconocidas internacionalmente cuentan con listas de chequeo que son llevadas para cada lote de material que es conservado. Es esencial mantener documentos que contengan los datos de los cultivos, sobre todo si varias personas están involucradas en el proceso (Simione, MS and Brown, BS; 1991). Esta información puede estar almacenada en libretas, archivos o registros, tarjetas indexadas, o en sistemas semi o completamente computarizados (Iglesias, 1999; Smith, 2000). Los datos originales suministrados por el depositador deben ser registrados (datos del mantenimiento, caracterización de las cepas, etc.). La mayor cantidad de información debe ser registrada y actualizada regularmente, esto incrementa el valor de una colección de cultivos (Hill, LR y Kirsop,; 1991; Sly, 1992).

Las siguientes listas proveen el tipo de información que debe ser registrada:

A- Registros de cepas:

1-Aspectos esenciales:

- a) # de referencia en el laboratorio
- b) # alternativo (colección de servicios, otros laboratorios)
- c) nombre (si se conoce)
- d) datos del depósito
- e) requerimientos del cultivo (medio, temp., pH, requerimientos nutricionales)
- f) métodos de mantenimiento

2-Otros aspectos:

- a) usos del cultivo (cepa de producción, cepa de ensayo, prueba de esterilidad)
- b) Propiedades del cultivo (fisiológicas, morfológicas, genéticas)
- c) Referencias

B- Registros del Mantenimiento:

1-Información del subcultivo (medio, temperatura)

Registros del período de almacenamiento (fecha, características culturales, etc.)

2-Información de la liofilización (métodos de crecimiento, concentración celular del inóculo, medio de suspensión, # de ampulas que se prepararon, almacenamiento, procedimiento de recuperación)

Registros (fecha de realización del proceso, # de lote, conteo de viables antes y después del proceso, fecha de vencimiento del lote, # de ampulas almacenadas).

3-Información sobre el almacenamiento en Nitrógeno (líq.) (Métodos de crecimiento, concentración celular del inóculo, criopreservante, temperatura de congelación, # de viales que se prepararon para el almacenamiento, procedimiento de recuperación).

Registros (fecha de congelación, # de lote, conteo de viables, fecha de vencimiento del lote, # de viales criopreservados)

C- Registros para el suministro de cultivos:

Fecha de entrega, persona que solicita el cultivo, propósito de la solicitud, información suministrada por el usuario (retroalimentación)

Las colecciones deben contar con procedimientos normalizados de manera que todo el personal pueda utilizarlos para la ejecución de las operaciones de rutina. El sistema de documentación de la colección de cultivos debe incluir además, el registro de estas operaciones, lo cual constituye una evidencia del trabajo realizado y permite la trazabilidad de los resultados. Si es posible se deben elaborar manuales de procedimientos que aseguren la continuidad del trabajo, y estos deben ser dominados por todo el personal incluyendo el personal en entrenamiento (Smith, 1996).

### **2.5.2- Identificación y autenticidad de las cepas**

Para una colección de cultivos es esencial contar con cepas identificadas, pues coleccionar materiales sin datos descriptivos puede conllevar a la duplicación innecesaria y a la pérdida de recursos. Un organismo no es útil si no se conoce nada acerca de él. Si un organismo no puede ser completamente identificado es necesario recopilar datos descriptivos, microfotografías, perfiles metabólicos, datos de secuenciación, entre otros (Smith, 1996).

El chequeo de autenticidad se realiza para comprobar que nuestro cultivo mantiene las características de la cepa original. Es importante demostrar que las características y funciones propias de nuestros microorganismos no están alteradas. Esto implica realizar una caracterización de las cepas, y la profundidad de este estudio depende de varios factores entre los que se destacan: recursos disponibles y naturaleza de los cultivos (Kirsop y Doyle, 1991)

### **2.5.3- Pureza**

El chequeo de pureza tiene como objetivo comprobar que los cultivos que conservamos se encuentran puros. Es obvio que las cepas deben estar puras, sin embargo en ocasiones es necesario conservar cultivos mixtos, pues existen cepas que no pueden crecer sin su simbiote u hospedero, pero esto debe estar bien definido y registrado. Este chequeo debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento (Smith, 1996), y puede realizarse en la misma placa petri con la cual se hace el chequeo de viabilidad. Estas placas son examinadas para detectar ausencia de contaminantes.

Es necesario tener en cuenta que existen microorganismos de crecimiento lento que pueden estar contaminando nuestros cultivos, por lo que estas placas se deben mantener por un período de tiempo mayor, y posteriormente se reexaminan (Hill, LR y Kirsop, BE; 1991). En ocasiones es necesario hacer chequeos de pureza utilizando varios medios de cultivo para descartar la presencia de microorganismos que requieren otras condiciones nutricionales para su crecimiento. En el caso de los hongos, por ejemplo, se puede realizar este chequeo en medios de cultivo que favorezcan el crecimiento de bacterias (Simione y Brown, 1991).

### **2.5.4- Monitoreo de viabilidad**

El chequeo de viabilidad se realiza con el objetivo de detectar el nivel de viabilidad del cultivo. Lo cual permite que en la medida que ésta disminuya se puedan tomar medidas para impedir la pérdida del material. Este chequeo al igual que el de identidad y pureza, debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento (Smith, 1996).

Este monitoreo puede realizarse por diferentes métodos; en el caso de la preservación por el método de subcultivo, es suficiente realizar un pase de cultivo a un medio fresco, este se incuba y posterior al tiempo de incubación se puede determinar si el cultivo está viable por la observación de colonias típicas del microorganismo; pero este método es cualitativo. En el caso de métodos de

conservación a largo plazo como la liofilización y congelación, este control se realiza cuantitativamente por el método de conteo en placas utilizando diluciones seriadas (Simione y Brown, 1991).

En el caso de la liofilización es importante llevar a cabo una determinación cuantitativa de las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) de la suspensión antes y después de la liofilización, esto constituye un control del proceso (Hill y Kirsop, 1991). Un método simple es rehidratar el vial liofilizado en 0.3-0.5mL de Caldo Nutriente o descongelar un vial criopreservado y adicionarlo a un tubo conteniendo 5-6mL de Caldo Nutriente. Esta suspensión se inocula (0.1mL) en tres puntos diferentes cercanos al borde de una placa petri conteniendo medio de cultivo agarizado. La placa se inclina para permitir que las gotas corran paralelamente a través de la superficie del agar, formando tres líneas. Los tubos de caldo y las placas se incuban y cuando el crecimiento es visible, se realiza un conteo y las placas que contengan menos de 100 colonias por cada línea se desechan y por consiguiente hay que obtener un nuevo lote del cultivo (Simione y Brown, 1991). Otros autores refieren como un nivel de viabilidad adecuado la recuperación del 50-75 % de las células preservadas, aunque tales niveles no pueden obtenerse con algunas células, pero esto debe quedar definido en los procedimientos documentados de la colección (Smith, 1996).

#### **2.5.5- Estabilidad de las propiedades de la cepa**

Las colecciones de cultivos deben desarrollar programas de investigación para determinar y asegurar la estabilidad de las cepas. Las propiedades conocidas deben chequearse periódicamente, pero para estimar la estabilidad con precisión debe seleccionarse una propiedad que no sea estable en la cepa y chequear su comportamiento en el tiempo (siempre que sea posible) (Smith, 1996). Los estudios de estabilidad pueden incluir el chequeo en el tiempo de la viabilidad, la pureza y la identidad de las cepas.

#### **2.5.6- Estandarización de las condiciones de crecimiento**

Es necesario cuando sea factible, realizar estudios para establecer las condiciones de crecimiento óptimas de los microorganismos de las colecciones de cultivos, pues esto favorece el proceso de conservación de los mismos (Sly, L., 1992).

#### **2.5.7- Metodologías y protocolos de preservación**

Las colecciones de cultivos deben desarrollar metodologías y protocolos para garantizar la preservación a largo plazo de sus recursos biológicos, deben estar documentados con todos los detalles de las operaciones y ser de dominio de todo el personal. Para cada microorganismo se debe seleccionar el método de preservación que garantice su conservación por un período de tiempo prolongado, así como el medio de preservación que proporcione adecuada protección durante el proceso de preservación. Estos protocolos de preservación deben incluir los controles

necesarios a realizarle a las cepas antes, durante y después de concluido el proceso, y pueden contemplar chequeos de viabilidad, pureza e identidad. Durante el proceso se pueden hacer controles de temperatura y otros dependiendo del método de preservación utilizado (Sly, L., 1992).

### **2.5.8- Mantenimiento de los equipos**

Todos los equipos de la colección de cultivos deben ser mantenidos y calibrados periódicamente, según los programas establecidos, lo cual asegura que estos operen dentro de los límites establecidos. Debe controlarse el uso y operación de los mismos, lo cual puede permitir la trazabilidad y reproducibilidad de los resultados. En el caso de los equipos especiales como las liofilizadoras, deben ser manipulados por personal competente (BPL, 1992; Smith, 1996).

### **2.5.9- Normas para el suministro e intercambio de cepas**

Otro aspecto importante es la distribución de los cultivos, pues las colecciones de cultivos suministran cultivos teniendo en cuenta la demanda de los mismos. Esta operación está regulada por normas locales, nacionales e internacionales que deben ser asimiladas por las colecciones de cultivo. La Unión Postal Universal y la Asociación de Transporte Aérea determinan los requerimientos para el traslado de sustancias biológicas frágiles, lo cual debe ser incorporado dentro de las legislaciones sobre intercambio de mercancía. Esto debe comprender la especificación de la categoría de sustancia infecciosa o no infecciosa, adecuado empaquetamiento y sellado y el intercambio solo puede efectuarse entre laboratorios reconocidos a través de correos registrados (Sly, 1992).

Según Sly, (1992) existen algunas consideraciones que deben tenerse en cuenta para el traslado de cultivos:

- Enviar los cultivos liofilizados en ampulas
- Si es necesarios enviar cultivos activos, se deben utilizar cuñas de agar en frascos de cristal o plásticos con tapón de rosca
- Los cultivos en caldos deben ser enviados como última opción y solo en tubos o frascos con tapón de rosca
- Nunca se deben enviar por correo tubos de cultivos en caldos con tapas holgadas ni cultivos en placas petri

En estas operaciones está involucrado personal no científico, por lo que es necesario tomar todas las precauciones necesarias. Los científicos y los encargados del transporte deben discutir las medidas de seguridad antes del traslado de los cultivos (Hill y Kirsop, 1991).

La NCTC tiene un folleto que plantea varias condiciones para el suministro de los cultivos, entre las que se destacan:

- El usuario tiene que leer las especificaciones
- Los cultivos deben ser utilizados por el usuario o bajo su supervisión personal o por personal autorizado por él
- Los cultivos de patógenos riesgosos son sujetos a condiciones especiales y solo son suministrados a determinados Departamentos
- El usuario tiene la responsabilidad de asegurar una manipulación segura del cultivo (Hill y Kirsop, 1991)

Algunos países como Estados Unidos exigen evidencias de que el usuario está entrenado en Microbiología y tiene acceso a equipamiento de laboratorio y debe asumir todos los riesgos y responsabilidades del uso de los cultivos. Similares procedimientos operan en otros países y siempre están regulados por la mayor Colección Nacional (Hill y Kirsop, 1991).

#### **2.5.10- Seguridad a largo plazo**

Desde la introducción de los conceptos de salud y seguridad en algunos países como Inglaterra y otros de la Unión Europea, se han emitido una amplia gama de guías, regulaciones y recomendaciones para la manipulación de microorganismos en instalaciones de investigación y producción, y existen grupos de trabajo encargados de asegurar que los procedimientos de seguridad se establezcan y mantengan en todas las instituciones. Es peligroso no tomar precauciones contra los riesgos reales relacionados con la manipulación de microorganismos debido a la patogenicidad real o potencial sobre animales, plantas e incluso al hombre (Hill y Kirsop, 1991).

Las normas de práctica para seguridad en laboratorios de Microbiología se pueden aplicar a las colecciones de cultivos (Hill y Kirsop, 1991; Sly, 1992). Estas deben ser dominadas por el personal que trabaja directa (curador y personal que trabaja directamente con los cultivos) e indirectamente (transportistas) en la colección de cultivo. Se debe tener conocimiento de las Leyes de Seguridad Biológica, en las cuales aparecen agrupados los microorganismos en categorías teniendo en cuenta el nivel de riesgo que ellos representan a los trabajadores y a la comunidad (Ley de la Seguridad Biológica Decreto Ley No.190, Gaceta Oficial, Cuba, 1999; Hill y Kirsop, 1991).

En el caso de los microorganismos manipulados genéticamente existen guías que contienen los requerimientos establecidos para el control de los experimentos de manipulación genética. Estas pueden ser locales o regionales. En Inglaterra existe un Comité Asesor para la Manipulación Genética (Hill y Kirsop, 1991).

Según Simione y Brown, 1991 (ATCC) existen una serie de medidas que garantizan la seguridad de las colecciones:

- Mantener los cultivos en condiciones de almacenamiento adecuadas.
- Tener un sistema de bancos de semillas para evitar la pérdida del cultivo original.
- Mantener copias de cada cepa almacenadas en dos lugares diferentes; o incluso en otra Institución.
- Mantener los microorganismos por dos métodos de preservación diferentes (Smith,1996)
- Mantener registros fieles que contengan localización y número de viales por cepa.

Cuando se utiliza la criopreservación y liofilización como métodos de preservación se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

Tabla 1. Recomendaciones para el uso de los métodos criogénico y liofilización para la preservación de microorganismos.

<b>Almacenamiento criogénico</b>	<b>Almacenamiento por liofilización</b>
La exposición a temperaturas criogénicas debe ser minimizada ya que se puede perder la sensibilidad en las manos.	Monitorear el nivel de contaminación durante el proceso de liofilización
El Nitrógeno líquido debe usarse en áreas adecuadamente ventiladas.	Implementar sistemas de descontaminación
Las ámpulas deben estar bien selladas pues pueden explotar cuando se sacan del Nitrógeno líquido	Utilizar instalaciones solo para realizar el proceso de liofilización de microorganismos.
Usar viales plásticos	Usar viales de cristal preferiblemente
Uso de aditamentos protectores para la manipulación del Nitrógeno líquido	

Cuando se manipulan microorganismos se debe evitar la generación de aerosoles durante la dispensación de los frascos que serán preservados y en la apertura de los frascos de cultivos preservados. Para microorganismos de riesgo es necesario trabajar en un gabinete de Seguridad Biológica Clase II (Sly, 1992; Simione y Brown, 1991).

Durante el proceso de preservación puede ocurrir pérdida de los cultivos y es importante detectar el paso dentro del procedimiento que afectó la viabilidad. Esto puede realizarse chequeando viabilidad en varias etapas del proceso. Entre los aspectos que pueden afectar la viabilidad se encuentran: aditivo; tiempo durante el cual el microorganismo está en contacto con el aditivo a temperatura ambiente; fase de crecimiento a partir de la que se preservan los microorganismos; condiciones de crecimiento de los microorganismos; uso de formas resistentes (esporas); en el



caso de la liofilización: temperatura de congelación, tiempo de secado, temperatura y tipo de fluido de rehidratación, extensión del secado; temperatura de almacenamiento.

#### **2.5.11- Control de las condiciones ambientales**

Se deben mantener controles de las condiciones ambientales de los locales de trabajo, así como de los equipos utilizados para la conservación de los microorganismos. Esto implica conservar registros diarios de temperatura, humedad relativa, y otros según se requiera; lo que garantiza conocer el comportamiento de estos parámetros y tomar decisiones en el momento necesario. Una variación en las condiciones ambientales de conservación de los organismos puede afectar su viabilidad y estabilidad (BPL, 1992).

#### **2.5.12- Auditorías**

Es muy importante que los procedimientos y normas establecidas en una colección de cultivos sean monitoreados a cada nivel, a través de auditorías. Estas deben llevarse a cabo por personal competente y pueden ser internas o externas. Estas últimas pueden ser producto de procesos de acreditación por organismos nacionales competentes. El registro de estas auditorías es vital para demostrar la competencia del laboratorio (BPL, 1992; Smith, 1996).

#### **2.5.13- Cumplimiento de las legislaciones**

Existen muchas regulaciones que se aplican al trabajo de las colecciones de cultivos desde el aislamiento y la manipulación, hasta la distribución y su transporte. El personal de las colecciones debe conocer de tales regulaciones, estas abarcan el embalaje, envío y transporte; seguridad y salud; así como la acreditación (Smith, 1996; Smith, 2000).

#### **2.5.14- Personal y entrenamiento**

El personal que labora en la colección de cultivos debe tener alta calificación y debe estar entrenado en las operaciones desarrolladas en la colección de cultivos a la que pertenece. Se debe garantizar el adecuado entrenamiento para este personal, así como para el de nuevo ingreso. Este último estará bajo supervisión hasta que adquiera las habilidades necesarias. El entrenamiento y la capacitación pueden incluir programas de maestrías y doctorados (BPL, 1992; Hall y Hawksworth, 1996).

## Bibliografía

1. ATCC, 2000. Frequently Asked Questions. Bacteriology FAQ <http://www.atcc.org/>
2. Buenas Prácticas para la fabricación de Productos Estériles. 2002. Anexo de la Regulación 16-2006 CECMED. Directrices sobre Buenas Prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos.
3. Catálogo de Cepas de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmGH (DSMZ). 1997. <http://www.gbf.de/DSMZ/dsmzhome.html>.
4. [Catálogo de la Cultura Collection of Algae and Protozoo \(CCAP\). 1995. 6ta ed. URL:http://www.wiua.nwi.ac.uk/ccap/ccaphome.html](http://www.wiua.nwi.ac.uk/ccap/ccaphome.html)
5. Day, J. 2000. Databases, Catalogues and Websites. Curso de Gerencia y Mantenimiento de Colecciones de Cultivos, Cuba.
6. Day, J., 1998. Quality System for Culture Collection Management. UKFCC Newsletter. Issue 28 ISSN 0266-9846.
7. Decreto Ley No.190: Ley de la Seguridad Biológica, Gaceta Oficial, Cuba, 1999.
8. Doyle, A. 1999. Guidelines for the Establishment and Operation of Collections Cultures of Microorganisms (second edition).
9. Gherna, R.L. 1991. ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze-Drying. (Simione, M.S. and Brown, B.S. eds).
10. Gherna, RL. 1994. Preservation Culture. Methodes for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology Washington. Chapter 12.
11. Hall, GS and Hawksworth, DL. 1996. Microbial Resources for Biosystematics in Europe. Biological Journal of the Linnean Society, in the press.
12. Hawksworth, D.L. and Aguirre-Hudson, B. 1994. International Initiatives in Microbial Diversity. En: The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centres. B.E. Kirsop and D.L. Hawksworth (eds). WFCC. Biodiversity Committee. pp. 65-72.
13. Hawksworth, D.L. and Kirsop, B.E. 1988. Living Resources for Biotechnology: Filamentous Fungi. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p 209.
14. Hawksworth, D.L. and Schipper, M.A.A. 1989. Criteria for consideration in the accreditation of culture collection participating in MINE. The microbial information Network Europe. MIRCEB Journal, pp 277-281.
15. Hawksworth, D.L.; Sastramihardja, I.; Kokke, R. y Stevenson, R. 1990.- Guidelines for the Establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. Simworth, Press, Richmond, Surrey, UK.
16. Heidrich, M.; Rojas, N y López, M. 1996. Utilización de zeolita en la conservación de microorganismos. En: Primer Taller sobre Colecciones de Cultivos. Libro de resúmenes. Instituto Finlay, Cuba. pp 9-10.

17. Heinz, Stolp. And Mortier, P. Starr. 1983. Principles of isolation, cultivation and conservation of bacteria Chapter 5. The Prokaryotes. "A Handbook on Habitats, isolation and identification of Bacteria. p. 167
18. Hill, L.R. 1981. Preservation of Microorganisms. Essays in Applied Microbiology Ed. By J.R. Norris and M.H. Richmond.
19. Hill, L.R. and Kirsop, B.E. 1991. Living Resources for Biotechnology. Bacteria. Cambridge. Cambridge University. p 186.
20. Hill, LR, Kokur, M. and Malik, KA, 1991. Culture and Maintenance. En: Living resource for Biotechnology. Bacteria. (LR Hill y BE Kirsop eds). pp 62-80.
21. IATA. 1998. Dangerous Goods Regulations, 39th edn. IATA, Geneva.
22. Iglesias, Elsie. 1999. Colección de Cultivos Finlay. Conservación de bacterias patógenas para la producción de vacunas para uso humano. Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, UH, Cuba.
23. ISO 9001:2000. Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos
24. Kirsop, B.E. 1990. "100 Years of Culture Collections" Proceedings of the Kral Symposium to Celebrate the Centenary of the Establishment of the First Recorded Service Culture Collection. W.F.C.C. Sep. 19. Ed. by Institute for Fermentation, OSAKA, Japan
25. Kirsop, B.E. and Doyle, A. 1991. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press. London.
26. Kirsop, B.E. and Hawksworth, D.L. 1994. The biodiversity of microorganisms and the role of Microbial Resource Centres. W.F.C.C
27. Kirsop, B.E. and Kurtzman, C.P. 1988. Living Resources for Biotechnology: Yeast. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p 234.
28. Kirsop, B.E. and Snell, J.J.S. 1984. Maintenance of microorganisms. A manual of Laboratory Methods Academic Press
29. Kirsop. B.E. 1983. Culture Collections-Their services to biotechnology. Trends in Biotechnology. Vol. (1)
30. Llop, Alina; Fernández, C.; Moliner, L.; Otero, A.; Alfonso, Marta; Iglesias, E.; Menéndez, J.C. 1998 (jul). Colecciones de organismos biológicos típicos y biomoléculas relacionadas. Informe presentado al Frente Biológico. Cuba.
31. Malik, K.A. 1991. Maintenance of Microorganisms by simple methods. En: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual Laboratory Methods. B.E. Kirsop y A. Doyle (eds.). 2nd edition. Academic Press, London. pp 121-132.
32. Malik, K.A. 1995. A miniaturized Method for Freeze-Drying of Microorganisms in Glass Capillary tubes. Journal of Microbiological Methods. 21:75-82.
33. Malik, K.A., and Hoffmann, P. 1989. Preservation and Storage of Biotechnologically Important Microorganisms. Chimicaoggi. Review.

34. Malik, K.A. 1992. Freeze drying of microorganisms using a simple apparatus. En: Technical Information for Culture Collections Curators in Developing Countries. Education Committee. U/W 29-32. K. A. Malik (ed).
35. Martínez, Jovita. 1982. Catálogo de cultivos microbianos. Dpto. Bioingeniería y Biotecnología. Centro de Investigaciones Avanzadas IPN (1ra ed.).
36. Montes de Oca, Nivian; González, Isel; Amador, Adrianis. 1996. Sistema computarizado para el control de una colección de cultivos. Revista de Salud Animal, vol. 18, No.1, pp 23-26.
37. Nakase, T. 1996. Quality Control Systems of Microbial Cultures in Japan Collection of Microorganisms (JCM), Ch.5. Culture Collections to Improve the Quality of Live, Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections. Veldhoven, The Netherlands. pp 144-147.
38. NC 26:212 1992 Buenas Prácticas de Laboratorios. Norma cubana
39. NC ISO 9001:2001. Sistemas de Gestión de la Calidad - Requisitos.
40. Norris, JR and Ribbons, DW. 1970. Métodos en Microbiología. Edited by Academic Press and New York.
41. Packer, P. and Doyle, A. 1996. The Camp Bacterial Cultura Collection (CBCC): The Establishment of a New Cultura Collection According to WFCC Guiderlines. Ch.5. Culture Collections to Improve the Quality of Live, Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections. Veldhoven, The Netherlands. pp 147-150.
42. Pérez, Gladys. 1998. Colección de Bacterias Marinas: Detección de cepas con actividad antimicrobiana. Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, UH, Cuba.
43. Pérez, Gladys. 1998. Reporte del trabajo Realizado por el Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos Microbianos. En: Boletín informativo No. 1 del Centro de Información para Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos.
44. Pérez, Gladys. 1999. Control de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. En: Boletín informativo No. 2 del Centro de Información para Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos.
45. Pérez, Gladys. 2000. Actividades Realizadas por el Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos Microbianos. En: Boletín informativo No. 4 del Centro de Información para Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos.
46. Porter, J.R. 1976. The World View of Culture Collections. En: The Role of Culture Collections in the Era of Molecular Biology. R.R.Colwell (ed.). American Society for Microbiology. Washington.
47. Proyecto de Reglamento de Colecciones de Células, Microorganismos y Genes de la Academia de Ciencias de Cuba, ACC, 1993.
48. Resolución No. 76/2000. Reglamento para el otorgamiento de las autorizaciones de seguridad biológica. Cuba.

49. Rudge, R.H. 1991. Maintenance of Bacteria by Freeze-Drying. En: Maintenance of Microorganisms. Second edition. Academic Press. ISBN 012-410351-0.
50. Ryan, M.J., Smith, D. and Jeffries, P. 2000. A Decision-based Key to Determine the Most Appropriate Protocol for the Preservation of Fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 16:183-186.
51. Sharma, B. and Smith, D. 1999. Recovery of Fungi after Storage for over a Quarter of a Century. Technical Communication. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 15:517-519.
52. Sidiyakina, T.M. 1991. Low Temperatura Freezing of Micoorganisms on Silica Gel. En: Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. B.E. Kirsop and A. Doyle (eds). 2<sup>nd</sup> ed. Academy Press. London, pp 65-70.
53. Skerman, V.B.D. 1976. The Organization of a Small General Culture Collection. En: Proceedings of the Second International Conference on Culture Collections. A.F. Prestana de Castro; E.J. Da Silva; V.B.D. Skerman and W.W. Leveritt (eds.).UNESCO/UNEP/ICRD/WFCC/WDCM. Brisbane. pp 20-40.
54. Sly, L. 1992. Maintenance and Preservation of Microbial Cultures in a Laboratory Culture Collection. NATA Technical Note #14. pp 1-16.
55. Smith, D. 1993. Tolerance to Freezing and Thawing. In: Tolerance of Fungi. D.H. Jennings (ed). New York, USA: Marcel Dekker Inc. pp. 145-171.
56. Smith, D. 1996. Quality Systems for Management of Microbial Collections. Ch.5. Culture Collections to Improve the Quality of Live, Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections. Veldhoven, The Netherlands. pp 137-143.
57. Smith, D. 2000<sup>a</sup>. Culture Collection Function and Quality Management. Curso de Gerencia y Mantenimiento de Colecciones de Cultivos, Cuba.
58. Smith, D. and Kolkowski, Jacqueline. 1996. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry Fungi Chapter 6 by Academic Press. Inc
59. Smith, D. and Onions, A.H.S. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2<sup>nd</sup> ed. IMI Technical Handbooks No.2, pp122. Wallingford, UK: CAB international.
60. Smith, D; 2000. Legislation Affecting the Collection, Use and Safe Handling of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB international 2000. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. (Navon, A. and Ascher, KRS. Eds). Pp. 295-314.
61. Snell, J.J.S. 1991. General Introduction to Maintenance Methods. En: Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. B.E. Kirsop ane A. Doyle (eds). 2<sup>nd</sup> ed. Academy Press. London, pp 21-30.
62. Snell, J.J.S. and Kocur, M. 1991. Maintenance of Bacteria in Gelatin Disc. En: Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. B.E. Kirsop ane A. Doyle (eds). 2<sup>nd</sup> ed. Academy Press. London, pp 51-56.

63. Stackebrandt, E. 1994. Uncertainties of Microbial Diversity, in Microbial Diversity and the Role of Microbial Resource Centres, WFCC.
64. Stevenson, R.E. and Jong, S.C. 1992. Application of Good Laboratory Practice (GLP) to Culture Collections of Microbial and Cell Cultures. W.J.M.B 8 (3): 229-232
65. ten Kate, K. 1995. 'Access to ex-situ Collections: Resolving the Dilemma?' Global Biodiversity Forum, Jakarta, 4/5 November, 1995. WRI/IUCN/ACTS book on Access.
66. Uruburu, F., 1996. Papel de las Colecciones de Cultivo en la Calidad Microbiológica. Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona. España. Julio.
67. World Data Centre for Microorganisms (WDCM). 2002. The Culture Collection in this World: WDCM Statistics (URL <http://www.wdcm.riken.gov.jp/wfcc/wfcc.html>).
68. World Federation for Culture Collection (WFCC), Biodiversity Committee. 1996. Information Document on Access to *ex-situ* Microbial Genetic Resources within the Framework of the Convention on Biological Diversity. Printed by the Tropical Data Base and made available online by the World Data Centre for Microorganisms (URL <http://wdcm.nig.ac.jp/wfcc/wfcc.html>).
69. Yamasato, K. 1992. Deteriorated/Deteriorating Culture Collections. En: Endangered Culture Collections. Proceedings of the First and Second International Symposia. R.R.Colwell (ed.). pp. 45-50.