Revista Latinoamericana de Microbiología (1999) 41:35-41
Asociación Latinoamericana de Microbiología

Conservación de Cultivos de Rizobios

J. R. J. FREIRE AND M. L. SATO*.

Laboratório de Microbiologia del Suelo, Universidad Federal de Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 7712. Porto Alegre (RS) 90001-970. Brasil.

*Corresponding author

ABSTRACT. The methods for rhizobia strain preservation include short-term methods like subculture, preservation in water, drying and freezing. Long-term preservation include ultralow temperature freezing in liquid nitrogen and lyophilization. The advantages and disadvantages of each method and the criteria for selecting a preservation method are indicated in this review.

RESUMEN. Entre los métodos utilizados para la conservación de cepas de rizobios están los considerados de corto plazo como el subcultivo, la conservación en agua, la deshidratación y el congelamiento. De los métodos de largo plazo tanto el congelamiento a temperaturas ultra-bajas en nitrógeno líquido y la liofilización son usados. Las ventajas y desventajas de cada método se indican en esta revisión, así como los criterios que deben ser utilizados en la selección de un método de conservación.

INTRODUCTION

Los rizobios son bacterias capaces de formar nódulos en las raíces y tallos de las leguminosas y, en simbiosis con éstas, fijan nitrógeno del aire. Desde su descubrimiento, éste es, sin duda, uno de los fenómenos biológicos mas exitosamente explotados por el hombre. En todo el mundo son producidos cultivos de rizobios impregnados en sustratos (usualmente turba) que son utilizados para inocular diferentes leguminosas. Sólo en el Brasil durante 1997 fueron vendidos aproximadamente 13.5 millones de dosis de inoculantes (bolsas con 200 g de inoculante sólido o con 200 ml de inoculante líquido).

El éxito de la inoculación depende, entre otras cosas, de la eficiencia con que el rizobio fija el nitrógeno, por lo que, la selección de cepas eficientes es una de las prioridades en los estudios con rizobios. Esa selección es un proceso largo e implica considerable tiempo y trabajo. Por otro lado, en los últimos años, el avance en las técnicas moleculares ha permitido modificar genéticamente rizobios lo que ha generado cepas con características específicas que poseen un valor adicional.

Los cultivos de rizobios como otros cultivos microbianos son extremadamente vulnerables y pueden contaminarse, mutar o morir.[43] Mantener los rizobios en estado viable y sin modificaciones en sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas es uno de los problemas que tanto los investigadores como los productores de inoculantes enfrentan. A pesar de la importancia de la conservación de cultivos de microorganismos, este es un tema poco investigado y menos divulgado. El presente trabajo es una revisión del conocimiento adquirido en la conservación de cepas de rizobios.

SUBCULTIVO

El método más simple y más utilizado para la conservación de bacterias consiste en la transferencia periódica del cultivo en un medio líquido o sólido y su incubación a temperatura adecuada hasta la obtención del crecimiento.[33] El subcultivo en medio conteniendo agar ha sido utilizado para la conservación de cultivos de rizobio desde los inicios de la rizobiología.[23] Los cultivos deben ser mantenidos por duplicado, uno de los tubos constituye el cultivo de trabajo y el otro es un cultivo de reserva que va ser usado sólo si el primer tubo es inutilizado por contaminación o por pérdida de viabilidad. Si hay necesidad de usar el cultivo de reserva, este debe ser repicado en dos nuevos tubos.[50] El medio de cultivo tradicionalmente utilizado es el de extracto de levadura-manitol,[47] sin embargo si las cepas presentan características como resistencia a antibióticos o tolerancia a acidez o sales es recomendable que en el medio sea adicionada la concentración correspondiente del antibiótico o nutriente para asegurarse que el cultivo no pierda esa característica específica.[8] Este método es simple y barato en términos del equipamiento necesario, sin embargo, la probabilidad de contaminación es el mayor problema y el riesgo aumenta en cada subcultivo por lo que es recomendable examinar la pureza de la cepa después de cada transferencia y hacer una caracterización simplificada. Por otro lado, los cultivos en agar son más propensos a ser genéticamente inestables y pueden perder la infectividad o la efectividad. El riesgo de modificaciones aumenta con la frecuencia de las replicas.[47] Los intervalos entre las resiembras van a depender de la especie y estirpe del rizobio. Es recomendable repicar entre 50 a 100 colonias pues cuando se toma sólo una colonia la posibilidad de aislar una mu-

www.medigraphic.org.mx

tante es mayor.[50] Con este método existe el riesgo de infestación por ácaros, además, si el número de cepas es grande o necesitan de frecuentes subcultivos, implica una labor intensa y existe la posibilidad de errar al rotular las cepas. También es necesario un espacio amplio para el almacenamiento de los cultivos.[42]

El almacenamiento en refrigeración (4 a 6 °C) de los tubos permite reducir la tasa metabólica de las células y permite aumentar el tiempo de conservación. Los tubos deben ser llenados con agar a 1/3 de su capacidad y dejados enfriar en posición inclinada antes de ser repicados. Los cultivos pueden ser almacenados por 2 a 3 meses, pasado ese tiempo el agar se deshidrata y la probabilidad de perder la cepa aumenta.[8] Una forma de prolongar el tiempo de almacenamiento y disminuir la deshidratación del medio es restringiendo la disponibilidad de aire mediante el uso de tubos con tapa de rosca, garrafas McCartney o cubriendo las tapas de algodón o de rosca con papel parafilm.[8,45] También es posible cubrir el cultivo desarrollado, con aceite mineral (parafina de densidad 0.869 a 0.890) esterilizado en horno a 170 °C por 1 a 2 h, o en la autoclave a 121°C por 15 min. dos veces. El aceite es colocado sobre la superficie del cultivo a una altura de 1.5 cm para tubos con agar inclinado o 2 cm para tubos con agar profundo. Esto previene la perdida de viabilidad, pues el rizobio es muy susceptible a la desecación y muere rápidamente.[14] Los tubos deben ser guardados en posición vertical, de preferencia a 5 °C.[50]

Se deben realizar pruebas de viabilidad periódicamente y la recuperación puede ser hecha repicando la cepa en medio de cultivo nuevo. La cepa original debe ser guardada por algunas semanas hasta que el subcultivo crezca, así en caso de presentarse algún problema, una nueva transferencia puede ser realizada. Este método ha sido recomendado para la conservación de rizobios por períodos relativamente cortos. Means and Erdman (1963, citado por Keyser[32]) encontraron que 70% de los 462 cultivos de rizobio, perdieron viabilidad después de 7 a 8 años de almacenamiento a temperatura ambiente. Los rizobios para frijol, trébol blanco, arverja y lupino fueron los que presentaron el menor número de cepas viables y las sobrevivientes perdieron la capacidad de fijar nitrógeno. De manera opuesta, Date and Halliday reportaron que 95% de las 107 cepas de rizobio, preservadas por este método, sobrevivieron por más de 20 años manteniendo su capacidad simbiótica.[15] Este método evita la infestación por ácaros pero presenta las otras desventajas del subcultivo, además es necesario tener cuidado cuando el asa es flameada pues el aceite puede salpicar contaminando al operador y/o el área de trabajo.[24]

CONSERVACIÓN EN AGUA

La conservación de microorganismos en agua es un método que es usado con diversos fitopatógenos[19,28] y también ha sido utilizado en la preservación de los rizobios. La cepa es cultivada en medio líquido y después de concentrada por centrifugación es resuspendida en un volumen igual de agua destilada o desionizada esterilizada. Crist *et al.* reportaron que tres cepas de rizobio de soya y dos rizobios de caupí suspendidas en agua desionizada permanecieron viables por más de 16 meses.[12] En cambio cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *S. meliloti* y una de rizobio de *Leucaena* sometidas a las mismas condiciones no sobrevivieron. Resultados similares fueron reportados para la cepa B323 de *S. meliloti*[10] y para *R. phaseoli.*[17] Los rizobios de crecimento lento (*Bradyrhizobium*) parecen ser más resistentes al almacenamiento en agua pero existe el riesgo de variación y la perdida de ciertas características. Wagner and Skipper reportaron que 23 cepas de *B. japonicum* permanecieron viables después de 66 meses de almacenamiento en agua destilada. Sin embargo, 30% de las cepas que eran resistentes a diferentes antibióticos perdieron ésa característica. Los autores concluyeron que el tiempo máximo de mantenimiento de esas cepas en agua debe ser limitado a 48 meses, después los rizobios deben ser cultivados en medio conteniendo el antibiótico adecuado.[48]

SECADO O DESHIDRATACIÓN

El secado como forma de preservar microorganismos ha sido utilizado extensivamente con los hongos, que parecen ser mas resistentes que otros microorganismos a la deshidratación. El método consiste en la remoción del agua evitando la rehidratación.[42] Las variaciones del método dependen del soporte utilizado que puede ser suelo, arena, sílica gel, papel (discos o tiras), pastillas (gelatina, almidón, peptona, dextrán) o perlas de porcelana.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, como otras bacterias Gram negativas, mueren bajo condiciones de secado y se ha encontrado que el rizobio declinaba rápidamente cuando era secado en películas encima de vidrio, esto no ocurría cuando el cultivo era colocado en algodón, donde sobrevivía de 11 a 16 días.[23]

El suelo, que es un reservorio natural de microorganismos, ha mostrado ser muy útil como soporte. Cepas de *S. meliloti* sobrevivieron 30 a 45 años, en suelo esterilizado almacenado a temperatura ambiente, al contrario de las cepas de *R. trifolii* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* que murieron en períodos de 4 a 10 años.[31] La principal dificultad es seleccionar adecuadamente el suelo que va ser utilizado debido a la variabilidad de textura y características físico-químicas.[50]

Una variación del método de secado hace uso de perlas de porcelana. El procedimento para rizobio es una modificación de Norris (1963 citado por Dye[20]) del método original ideado por Hunt et al. (1958 citado por Dye[20]). Los recipientes son preparados llenándolos hasta ¾ con sílica gel (azul cuando está seco, rosado cuando está húmedo) la que es cubierta con lana de vidrio, sobre ésta, son colocadas de 10 a 150 perlas de porcelana. Los recipientes son esterili-

www.medigraphic.org.mx

zados a 160-170 °C por 1-2 h, después las perlas son retiradas e inmersas en un caldo conteniendo el rizobio. El cultivo es absorbido en las perlas, el exceso de caldo es dejado drenar y las perlas son transferidas para el recipiente que es cerrado herméticamente. Los cultivos acondicionados de esta forma pueden ser almacenados a temperatura ambiente o en refrigeración. Para la reactivación, basta colocar una perla en medio líquido e incubarla en la temperatura adecuada. Este método es muy rápido y fácil y no necesita de manipulación durante el almacenamiento. Norris (1963 citado por Dye[20]) reportó que 10 cepas de rizobio preservadas por este método permanecieron viables durante 24 meses sin variaciones en la morfología y en sus características simbióticas. Por su parte Krishan et al. encontraron que diferentes cepas de *Rhizobium* y *Azotobacter* sobrevivieron por 14 meses en perlas de porcelana almacenadas a temperaturas entre 16.8 y 27.2 °C.[48] Date y Halliday recomiendan reprocesar los cultivos cada 3 a 4 años para asegurarse de que las células viables van a ser recuperadas.[15] Según esos mismos investigadores, la perdida de viabilidad es mayor entre los rizobios de crecimiento rápido debido a las diferencias individuales que han sido encontradas y recomiendan que la sobrevivencia de cada cepa debe verificarse antes de optarse por este método.[8]

LIOFILIZACIÓN

La liofilización o criodesecación es uno de los métodos más utilizados para la conservación de cepas de rizobio[15] y es considerado como el segundo mejor método de preservación después del almacenamiento en nitrógeno líquido.[50]

La liofilización consiste en un proceso mediante el cual el agua es retirada de un producto congelado por sublimación bajo presión reducida (vacío).[3] Este proceso se realiza en tres fases: primero el producto es precongelado para asegurar una estructura inicial sólidamente congelada, después se procede con el secado primario durante el cual 90 a 95% del agua es retirada y finalmente el producto es sometido a un secado secundario para retirar el agua restante. No toda el agua es retirada y lo que resta representa la humedad residual. Para volver a su estado original, los cultivos liofilizados necesitan ser rehidratados y colocados en un medio de cultivo adecuado. Mediante la liofilización, los cultivos de rizobio pueden ser conservados por períodos prolongados.[16,30] Atthasampunna et al. reportaron que sólo 2 de 168 cepas de rizobio que habían sido liofilizadas y almacenadas a 4 °C durante 11 años, no pudieron ser recuperadas después de reconstituidas. Las 166 cepas restantes eran viables y mantuvieron la capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno en la planta huésped.[7]

La sobrevivencia de la células después de la liofilización puede variar entre el 1 y el 80 por ciento y depende de varios factores.[15] La resistencia a la liofilización parece ser una característica inherente al organismo y algunos resisten mejor a este proceso. Han sido reportadas diferencias en la sobrevivencia según la especie de rizobio[21] y aún dentro de una misma especie.[46] La edad del cultivo también tiene influencia en la sobrevivencia, sin embargo la definición de una edad o de una fase de crecimiento "ideal" para la liofilización es difícil, pues depende de la especie de rizobio que se quiere preservar. Amarger et al. encontraron que la sobrevivencia de la cepa SAIO de *S. meliloti* después de la liofilización, fue mejor cuando los cultivos se encontraban en la fase logarítmica (30 h), sin embargo, las células que se encontraban en la fase estacionaria (96 h) sobrevivieron mejor al almacenamiento a 30 °C.[2] Dye no encontró diferencias en la sobrevivencia de cepas de rizobio para alfalfa y caupí que fueron liofilizadas en la fase logarítmica y en la fase estacionaria.[21] Sato reportó que la sobrevivencia de la SEMIA 587 de *B. japonicum* era mejor cuando la cepa fue liofilizada en la fase estacionaria (168 h) indicando que las células maduras y estabilizadas soportaron mejor la liofilización.[41]

Las condiciones de crecimiento también tienen influencia en la sobrevivencia pues ha sido demostrado que microorganismos cultivados con agitación y aireación son más resistentes que los cultivados en tubos con agar. Evidencias experimentales demuestran que las células cultivadas con aireación son más permeables, permitiendo una salida mas rápida del agua durante el enfriamiento proporcionando una mayor resistencia al congelamiento.[4]

Dentro de la liofilización, el congelamiento es un paso crítico pues tanto el congelamiento rápido como el lento son perjudiciales para los organismos vivos. Heckly recomienda para las bacterias un congelamiento lento a aproximadamente 1 °C/min.[27] La utilización de sustancias crioprotectoras puede mejorar la sobrevivencia, estas sustancias pueden ser adicionadas al medio suspensión que es utilizado para liofilizar la bacteria. Se considera que el medio "ideal" debe contener un material de soporte (dextrán 5%, albúmina de suero 5%) que permita la formación de una "pastilla" sólida y seca que proteja la bacteria durante la liofilización y prevenga la dispersión cuando la ampolla es abierta para la reconstitución, también debe contener una sustancia (sacarosa, glucosa o sorbitol a 5 o 10%) que mantenga la humedad residual en aproximadamente 1% a 2% y neutralizantes (peptona o glutamato de sodio al 1 o 5%) de los grupos carbonil que son tóxicos.[25,35,50] Algunos investigadores afirman que la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico permite prolongar la vida útil de los microorganismos liofilizados.[22,26] Uno de los medios de suspensión más utilizados para el rizobio es el que contiene 10% sacarosa + 5% peptona, sin embargo otro soporte como la leche desnatada (20%) también es usado.[7,50] Sato obtuvo similar porcentaje de sobrevivencia cuando la cepa SEMIA 587 de *B. japonicum* fue liofilizada en medio sacarosa 10% + peptona 5% o con leche desnatada al 10% + glutamato de sódio al 5%.[41]

Las condiciones de almacenamiento también ejercen influencia en la sobrevivencia de los rizobios liofilizados. La estabilidad del liofilizado es afectada por la temperatu-

www.medigraphic.org.mx

ra, el contenido de humedad y la presencia de oxígeno. El vacío dentro de la ampolla debe ser mantenido para mejorar las posibilidades de recuperación del cultivo, el oxígeno ejerce un efecto letal pues reacciona con el liofilizado disminuyendo la vida útil de éste. La reactividad es directamente proporcional a la temperatura del producto.[3] Varios investigadores han reportado que la sobrevivencia de diferentes especies de rizobio liofilizados es mejor cuando la temperatura de almacenamiento está entre 4 y 10 °C.[7,39,40,41] La luz del sol también ejerce un efecto nocivo, por lo que es recomendable almacenar los cultivos liofilizados protegidos de la luminosidad. Las condiciones en que es realizada la reconstitución del liofilizado también afectan la recuperación del cultivo, para *Spirillum* y *Lactobacillus* se reportó que, tanto la solución de reconstitución como la temperatura y el medio de cultivo utilizados, tuvieron influencia en el número de células que fueron recuperadas.[11,18] En el caso de *B. japonicum*, Sato no encontró diferencias en el porcentaje de recuperación de la cepa SEMIA 587, cuando la reconstitución fue realizada a 22 o 30 °C, ya sea usando agua destilada, solución de sales del medio levadura-manitol a ¼ de concentración o solución peptonada al 0.1%.[41,44] Después de la reconstitución los cultivos deben ser dejados crecer por períodos mas amplios de lo usual pues frecuentemente las cepas liofilizadas exhiben largos períodos lag.[50]

Los cultivos después de liofilizados están protegidos del riesgo de contaminación e infestación por ácaros. La liofilización también facilita la distribución y permite almacenar gran cantidad de cultivos ocupando menos espacio. Las principales desventajas del método son el costo del equipo necesario y la necesidad de mano de obra especializada. Por otro lado, la posibilidad de cambios genéticos en los microorganismos liofilizados ha sido muy debatida en los últimos años. A pesar de que la mayoría de reportes indican que los microorganismos sometidos a este proceso mantienen sus características, existen evidencias de que la liofilización puede ocasionar diversas modificaciones.[37,38,49] Estas pueden deberse a la selección de mutantes preexistentes en el cultivo o al daño ocasionado al DNA como resultado del proceso.[4,6,29] Ashwood-Smith reportó que la liofilización aumentó la liberación de bacteriófagos lambda en una cepa lisogénica de *Escherichia coli*.[6] La inducción de fagos temperados en cepas lisogénicas es un indicador de daño al DNA, pues cuando éste es afectado, el genoma viral integrado en el cromosoma bacteriano es liberado y se produce la formación y liberación de los bacteriófagos.

Una variación de la liofilización denominada de "L-secado" fue propuesta por Annear.[5] En éste método la suspensión de microorganismos es absorbida en fibras de celulosa o algodón, éstas son colocadas en ampolletas para ser secadas al vacío, el que es ajustado de manera a facilitar un secado rápido sin congelamiento. El medio de suspensión y la exposición al oxígeno también ejercen influencia en la sobrevivencia de las bacterias sometidas al L-secado.[15] Este método es considerado tan eficiente como la liofilización tradicional y es usado para conservar el germoplasma en la Colección de *Rhizobium* de Rothamsted.[21,32] Dye obtuvo porcentajes de sobrevivencia entre 43 a 84% cuando usó este método para conservar cepas de rizobio para alfalfa y caupí.[21] Cepas de rizobios que fueron almacenados por 16 años, crecieron sin problemas cuando fueron reconstituidos, a pesar de que algunas demoraron más del tiempo usual en mostrar crecimiento. Ninguna modificación en el comportamiento simbiótico de los cultivos fue detectada.[20]

CONGELAMIENTO

El almacenamiento de microorganismos a baja temperatura ha sido utilizado como método de conservación pues con el congelamiento el agua queda indisponible permitiendo una reducción en el metabolismo. El método consiste en hacer una suspensión del microorganismo, previamente cultivado en medio sólido, y congelarlo. Si el cultivo fue realizado en medio líquido, es necesario separar las células por centrifugación. El congelamiento puede ser en (ultra) congelador, con hielo seco o en nitrógeno líquido. Algunos autores consideran que temperaturas por encima de -30°C no son recomendables pues exponen a las células a altas concentraciones de sales dañándolas, sin embargo, el uso de crioprotectores permite mejorar la sobrevivencia.[21] Allievi y Salardi encontraron que la concentración celular de una cepa de *B. japonicum* conservada a -20°C durante 7 meses, era 1 $\log_{10}$ mayor cuando el cultivo era suspendido en 10% de leche desnatada antes de ser congelado.[1] El glicerol (20 o 40%) y el suero de leche también han sido utilizados como crioprotectores para rizobio, con buenos resultados.[9,20,36] Se puede mantener la viabilidad de los microrganismos conservados a -20°C por 1 a 2 años pero esta temperatura no es adecuada para la conservación a largo plazo. Para períodos más prolongados las células deben ser congeladas a temperaturas más bajas, siendo entre -75°C y -80°C las más comúnmente utilizadas. Keyser reportó que los cultivos de rizobio de la Colección del USDA-ARS en Beltsville, que fueron mantenidos entre -50°C y -80°C, permanecieron viables y mantuvieron sus propiedades simbióticas aún después de 4 años de almacenamiento.[32]

Una variación del método de congelamiento, incluye el uso de perlas de vidrio. El procedimiento consiste en impregnar las perlas (3 mm de diámetro) con una suspensión de la bacteria para después ser almacenadas a -70°C. Cuando un cultivo nuevo es necesario, una o dos perlas son colocadas en el medio de cultivo adecuado. Este método es muy rápido y fácil y no necesita de manipulaciones subsiguientes durante el almacenamiento.[42] Dalton usando este método, consiguió almacenar con éxito cultivos de *Rhizobium* spp., *Azotobacter* y *Klebsiella* por varios años.[13]

La sobrevivencia de los microorganismos conservados

www.medigraphic.org.mx

por congelamiento puede ser aumentada usando temperaturas ultrabajas las que pueden ser conseguidas con el uso de nitrógeno en la fase de vapor (-196°C) o en la fase líquida (-150 a 180°C). Estas temperaturas permiten el almacenamiento por períodos prolongados y la mayoría de bacterias pueden ser recuperadas con un 90 a 100% de sobrevivencia.[50] Microorganismos que no sobreviven a la liofilización o a otros procedimientos pueden ser conservados a largo plazo usando este método.[42] Los cultivos que van a ser congelados deben ser colectados en la fase logarítmica media o tardía.[50] Dye recomienda colocar el cultivo en pequeñas cantidades, en recipientes que permitan una rápida transferencia de calor.[20] Los crioprotectores que han sido más utilizados para la conservación del rizobio a temperaturas ultrabajas son, el glicerol (10 o 20%) y el dimetil sulfóxido (5 o 10%).[20,50] El volumen del crioprotector a ser utilizado debe ser aproximadamente igual al volumen de células que va ser congelado.[50] Para la reactivación es suficiente descongelar los cultivos rápidamente en baño María a 37°C hasta que el hielo derrita (1 a 2 min) para después sembrarlos en medio líquido. Los recipientes almacenados en nitrógeno líquido deben ser retirados con mucho cuidado pues pueden explotar. Recipientes cerrados de forma imperfecta también pueden explotar durante el descongelamiento, por lo que es recomendable colocar las ampolletas en un vaso de precipitados con agua tibia y no directamente en el baño.[30] Tanto el congelamiento como el descongelamiento pueden producir daños celulares y el control de la tasa de congelamiento es crítica, los mejores resultados de sobrevivencia y recuperación de células han sido obtenidos congelando a una velocidad de 1°C/min hasta -30°C y a 15-30°C/min hasta -150°C.[50]

Este método es considerado uno de los mejores métodos de conservación y los cultivos pueden ser conservados por períodos muy prolongados con buena estabilidad genética, sin embargo, a pesar de que las características generalmente se mantienen sin alteración, existen reportes de cambios en el núcleo y en los plásmidos en microorganismos que fueron conservados por éste método.[42] Con todo, se considera que la estabilidad genética de los microorganismos conservados a temperaturas ultra-bajas es mejor que la de aquellos sometidos a la liofilización.[42] Este método tiene la ventaja de ser menos laborioso que los otros, sin embargo, el uso de nitrógeno líquido tiene un costo inicial alto y requiere un laboratorio bien equipado con un suministro regular de nitrógeno.[50]

CONSIDERACIONES FINALES

Entre los métodos que están disponibles para la conservación de cepas de rizobio, el almacenamiento en nitrógeno es considerado el mejor,[42,50] sin embargo, debido a la posibilidad de interrupción en la disponibilidad de nitrógeno siempre debe mantenerse una colección en duplicado conservada por otro método. En general, las grandes Colecciones de Cultivos conservan las cepas mediante dos o más procedimientos y esto es lo más recomendable, no importa cuál sea el tamaño del cepario. También es necesario mantener una colección secundaria para los trabajos de rutina (investigación, producción de inoculantes etc) de esta forma la "colección madre" queda protegida del riesgo de contaminación o pérdida y sirve como última fuente y referencia.

La liofilización es una alternativa cuando el uso del nitrógeno no es posible. Sin embargo, debido al costo del equipo necesario, generalmente no es accesible para quien trabaja con colecciones pequeñas. La opción por un determinado método debe considerar el número de cultivos a ser conservados, la frecuencia de uso de los cultivos y el tiempo de conservación requerido además del clima, equipamiento, espacio físico, mano de obra experimentada y otras facilidades disponibles. Independientemente de la opción realizada, el método seleccionado debe ser evaluado periódicamente para garantizar su eficiencia. Esa evaluación debe incluir, además de la observación periódica de las características de la cepa, una prueba de infección en la planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allievi, L. and C. Salardi. 1993. Frozen storage (-20° and -80°C) of soybean *Bradyrhizobium* cell suspension. Lett. Appl. Microb. 16:196-08.
2. Amarger, N., M. Jacquemetton and G. Blond. 1972. Influence de l'âge de la culture sur la vie de *Rhizobium meliloti* à la lyophilisation et à la conservation aprés lyophilisation. Arch. Microbiol. 81: 361-406.
3. American Type Culture Collection. 1985. Freezing and freeze-drying, Rockville, American Type Culture Collection. 48 p.
4. American Type Culture Collection. 1991. ATCC Preservation Methods: Freezing and freeze-drying, Rockville, American Type Culture Collection. 42 p.
5. Annear, D. I. 1962. Recoveries of bacteria by drying on cellulose fibres. Austr. J. Exp. Biol. 40:1-8.
6. Ashwood-Smith, M. J. 1980. Induction of T bacteriophage in lysogenic bacteria by freeze-drying. Cryobiology 17:181-203.
7. Atthasampuna, P., W. Daengsubha, P. Budhaka and N. Boonkerd. 1988. Viabiliy of the freeze-dried *Rhizobium* cultures and their nitrogen-fixing abilities. In: International Congress Of Culture Collections, 6, 1988, Maryland. p.76
8. Beck, D. P, L. A. Materon and F. Afandi. 1993. Practical Rhizobium-Legume. Technology Manual, p.15-32., Icarda, Aleppo.
9. Bissonette, N. and R. Lalande. 1988. High survivability of cheese whey-grown *Rhizobium meliloti* cells upon exposure to physical stress. Appl. Environ. Microbiol. 54:183-87.
10. Boiardi, J. L., N. Moreni and M. L. Galar. 1988. Sur-

www.medigraphic.org.mx

vival and infectivity of a *Rhizobium meliloti* strain maintained in water and buffer suspensions. J. Bacteriol. 65:189-193.

11. Choate, R. V. and M. T. Alexander. 1967. The effect of the rehydration temperature and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. Cryobiology. 03:419-422.
12. Crist, D. K., R. E.Wyza, K. K. Mills, W. D. Bauer and W.R. Evans. 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and simbiotic infectivity by suspension in water. Appl. Environ. Microbiol. 47:895-900.
13. Dalton, H. 1980. The cultivation of diazotrophic microorganisms, p. 14-64. *In*: F. J. Bergersen (ed.). Methods for Evaluating Nitrogen Fixation. J. Wiley, Chichester.
14. Date, R. A. 1982. Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*, p.96-109. *In*: J. M. Vincent (ed.). Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Sidney.
15. Date, R. A. and J. Halliday. 1987. Collection, isolation, cultivation, and maintenance of *Rhizobia*, p.413-428. *In*: G.H. Elkan (ed.). Simbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, New York.
16. Davies, R. J. 1963. Viability and behavior of lyophilized cultures after storage for twenty-one years. J. Bacteriol. 85:486-487.
17. De Leon, R., M. Castellanos and C. Rolz. 1988. Storage in water of *Rhizobium phaseoli* cells harvested from continuo culture and its effect on biological nitrogen fixation. Biotech. Lett. 10:509-512.
18. De Váldez, G. F., G. S. De Giori, A. A. P. De Ruiz Holgado and G. Oliver. 1985. Rehydratation conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. Cryobiology 22:574-577.
19. Devay, J. E. and W. C. Schanothorst. 1963. Single cell isolation and preservation of bacterial cultures. Nature 199:775-777.
20. Dye, M. 1979. Functions and maintance of *Rhizobium* collection, p.435-471. *In*: Subba Rao (ed). Recent Advances in Nitrogen Fixation. Oxford University Press, Oxford.
21. Dye, M. 1982. A note on some factors affecting the survival of *Rhizobium* cultures during freeze drying and subsequent storage. J. Appl. Bacteriol. 52:462-464.
22. Fennell, D. I. 1960. Conservation of fungus cultures. Bot. Rev. 26:79-141.
23. Fred, E. B., I. L. Baldwin and E. McCoy. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. p.104-116. University of Wisconsin Press, Madison.
24. Gherna, R. L. 1981. Preservation. p. 208-217. *In*: P. Gerhardt (ed.). Methods for General Microbiology. American Society for Microbiology, Washington.
25. Greaves, R. I. N. 1960. Preservation of living cells by freeze-drying. Ann. N. Y. Acad. Sci. 85:723-728.
26. Heckly, R. J. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. Adv. Appl. Microbiol. 03:01-76.
27. Heckly, R. J. 1985. Principles of preserving bacteria by freeze-drying. Develop. Ind. Microbiol. 26:379-395.
28. Iacobellis, N. S. and J. E. Devay. 1986. Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water. Appl. Environ. Microbiol. 52:388-389.
29. Israeli, E, B. T. Shaffer, J. A. Hoyt, B. Lighthart and L. M. Ganio. 1993. Survival differences among freeze-dried genetically engineered and wild-type bacteria Appl. Environ. Microbiol. 59:594-598.
30. James, E. R. 1984. Maintenance of parasitic protozoa by cryopreservation. p. 161-176. *In*: B. E. Kirsop and J. J. S. Snell (ed.). Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, Inc., London.
31. Jensen, H. L. 1961. Survival of *Rhizobium meliloti* in soil culture. Nature 192:682-683.
32. Keyser, H. H. 1987. The role of culture collections. p. 413-428. *In*: G. H. Elkan (ed.). Simbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, New York.
33. Kirsop, B. E. 1984. Service collections: their functions, p.5-10. *In*: B. E. Kirsop and J. J. S. Snell (eds.). Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, Inc., London.
34. Krishan Chandra, P. K. Mukherjee, J. B. Kamarka and J. Singh. 1995. Survivability and preservation of *Rhizobium* and *Azotobacter* strain in porcelain bead at climatic conditions of Manipur. Environ. Ecol. 13:601-603.
35. Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 18:01-16.
36. Meade, J., P. Higgins and F. O'gara. 1985. Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. J. Appl. Bacteriol. 58:517-24.
37. Means, U. M. and L. W. Erdman. 1963. Longevity and efficiency of rhizobial cultures. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27:305-308.
38. Ohtomo, T., T. Yamada and K. Yoshida. 1988. Outermost-cell-surface changes in an encapsulated strain of *Staphylococcus aureus* after preservation by freeze-drying. Appl. Environ. Microbiol. 54:2486-2491.
39. Roughley, R.J. 1985. Production and quality control of legume seed inoculants in Australia. In: Freire, J. R. J. and C. P. B. Falcão (eds). Proceedings of the Workshop on Rhizobium/Legume inoculants, Porto Alegre, UFRGS p.37-42.
40. Safranova, V. I., N. I. Novikova, T. M. Sidyakina and L. T. Bosh'eva. 1991. Comparison of cryo-preservation and lyophilization as methods for long term storage of root-nodule bacteria. Mikrobiologiya. 60:368-376.
41. Sato, M. L. 1995. Sobrevivência e estabilidade genética da Semia 587 de *Bradyrhizobium japonicum* submetida à liofilização. Tesis de Doctorado. Facultad de Agronomia, Ufrgs. Porto Alegre, RS, Brasil.
42. Snell, J. J. S. 1984. General introduction to maintenance methods. p.11-19. *In*: B. E. Kirsop and J. J. S. Snell (ed.). Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, Inc.,

www.medigraphic.org.mx

London.

43. Snell, J. J. S and B. E. Kirsop. 1984. Introduction. p. 1-4. *In*: B. E.Kirsop and J. J. S. Snell (ed.). Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, Inc., London.
44. Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1991. Methods in legume-*Rhizobium* technology. p. 428-434. NifTAL, Hawai.
45. Thompson, J. A. 1980. Production and quality control of legume inoculants. p. 489-535. *In*: F. J. Bergersen (ed.). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley and Sons, New York.
46. Vincent, J. M. 1958. Survival of the root nodule bacteria. p: 108-123. *In* : E. G. Hallsworth (ed.). Nutrition of the legumes. Butterworths, London.
47. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IPB Handbook No 15. p.11-17. Blackwell, Oxford.
48. Wagner, S. C. and H. D. Skipper. 1993. Long-term storage of bradyrizobia in sterile water. Can. J. Microbiol. 39:998-1001.
49. Wróbel, T. 1960. Influence of the lyophilization of *Rhizobium* on its simbiotical activity. Act. Microbiol. Polon. 09: 181-189.
50. Zuberer, D. A. 1987. Collection, isolation, cultivation, and maintenance of associative N_2-fixing bacteria. p. 95-122. *In*: G. H. Elkan (ed.). Simbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, New York.

www.medigraphic.org.mx