

Evaluación del método de liofilización para la
crio-preservación de estirpes microbianas del género *Pseudomonas*.

María José Fiallo Rincón

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en Ciencias Agrícolas

Codirector

Diego Armando Villamizar Mantilla

Maestro en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mis papás, hermanas y sobrinas, por ser mi apoyo incondicional y mi polo a tierra.

Agradecimientos

Agradezco haber sido parte del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la UIS que me aportó los recursos necesarios para el desarrollo de esta pasantía, a mi director el Dr. Jorge Luis Fuentes, y a mi codirector, Diego Armando Villamizar, gracias por el apoyo, acompañamiento y conocimientos brindados durante la realización de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio por hacer parte fundamental del proceso, por aportarme motivación y un ambiente agradable, en especial a Carina Arciniegas Sierra, por enseñarme y acompañarme en cada etapa con mucha paciencia y dedicación.

A los amigos que me deja esta experiencia universitaria que me acompañan en cada reto de la vida, agradezco su apoyo y amistad. Y finalmente a mi familia que sin ellos nada sería posible, cada logro es por y para ellos.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	10
1. Objetivos.....	12
1.1. Objetivo general.....	12
2. Competencias de la pasantía	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Material biológico.....	13
3.2 Medios de cultivo.....	14
3.3 Reactivación y comprobación de la pureza de las cepas	14
3.4 Liofilización.....	15
3.5 Determinación de la carga microbiana pre- y post- liofilización.....	16
4. Resultados y discusión.....	16
5. Conclusiones.....	20
Referencias bibliográficas.....	21
Apéndices.....	25

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Lista de cepas evaluadas del género *Pseudomonas*.....13

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Media general de las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) de las cepas bacterianas evaluadas.....	17

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Valores de la media general de las unidades formadoras de colonia pre- y post-liofilización y porcentaje de supervivencia (%) por especie del género <i>Pseudomonas</i>	26
Apéndice B. Ilustración del ensayo de diluciones seriadas para el conteo UFC.....	27
Apéndice C. Registro fotográfico a nivel macroscópico (colonias) y microscópico (tinción diferencial Gram) de las cepas del género <i>Pseudomonas</i>	28

Resumen

Título: Evaluación del método de liofilización para la crio-preservación de estirpes microbianas del género *Pseudomonas**

Autor: María José Fiallo Rincón**

Palabras Clave: bacterias, colección microbiana, liofilización, crio-preservación, *Pseudomonas*.

Descripción: Este informe presenta la evaluación del método de liofilización utilizando leche descremada al 10% como agente crio-protector en 26 estirpes microbianas pertenecientes al género *Pseudomonas*, previamente almacenadas en el Cepario LMMA-UIS mediante crio-preservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 30%. Para llevar a cabo el estudio, se reactivaron las cepas y se verificó su pureza mediante tinción de Gram, asegurando así la calidad del material biológico antes del proceso de conservación. Posteriormente, se aplicó el protocolo de liofilización y se determinó la viabilidad celular mediante la media general del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de diluciones seriadas, obteniendo valores pre- y post- liofilización. Los resultados evidenciaron que 18 de las 26 estirpes presentaron una viabilidad significativa post-liofilización, definida por la presencia de suspensiones celulares superiores a 10^8 UFC/mL. Este hallazgo indica que la leche descremada al 10% actúa como un crioprotector eficaz para la mayoría de las cepas evaluadas, favoreciendo su supervivencia tras el proceso de desecación. Sin embargo, la variabilidad observada entre estirpes sugiere que la eficiencia del crio-protector no es uniforme, lo que resalta la necesidad de optimizar el protocolo para mejorar la tasa de recuperación microbiana.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Doctor en Ciencias Agrícolas. Codirector: Diego Armando Villamizar Mantilla. Maestro en Ciencias

Abstract

Title: Evaluation of the Lyophilization Method for the Cryo-preservation of Microbial Strains of the Genus *Pseudomonas**

Author: María José Fiallo Rincón **

Key Words: bacteria, microbial collection, lyophilization, cryo-preservation, *Pseudomonas*.

Description: This report presents the evaluation of the lyophilization method using 10% skim milk as a cryo-protectant on 26 microbial strains belonging to the genus *Pseudomonas*, previously stored in the LMMA-UIS Culture Collection by cryo-preservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 30% glycerol. To carry out the study, the strains were reactivated and their purity verified by Gram staining, thus ensuring the quality of the biological material before the preservation process. Subsequently, the lyophilization protocol was applied, and cell viability was determined by the overall mean of the colony-forming unit (CFU) count from serial dilutions, obtaining pre- and post-lyophilization values. The results showed that 18 of the 26 strains exhibited significant post-lyophilization viability, defined by the presence of cell suspensions greater than 10^8 CFU/mL. This finding indicates that 10% skim milk acts as an effective cryo-protectant for most of the strains evaluated, promoting their survival after the drying process. However, the variability observed among strains suggests that the cryoprotectant's efficiency is not uniform, highlighting the need to optimize the protocol to improve the microbial recovery rate.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Biology. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, PhD in Agricultural Sciences. Co director: Diego Armando Villamizar Mantilla, MSc in Sciences.

Introducción

Los microorganismos representan la mayor parte de la biodiversidad de los organismos vivos en todos los hábitats ecológicos, es por tal razón, que las colecciones microbianas desempeñan un papel fundamental como repositorios *ex situ* de la biodiversidad y como proveedores de microorganismos útiles e información relacionada para la investigación. En tal sentido, las colecciones deben contar con estrategias a largo plazo para preservar y mantener organismos durante mucho tiempo sin cambios genéticos significativos (McCluskey, K., 2017; De Vero et al., 2019)

Actualmente, el Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA-UIS) preserva sus microorganismos usando el método de crio-preservación en glicerol; el cual ha mostrado limitaciones con algunos grupos microbianos y requiere del uso de ultra-congeladores (-80°C) con suministro de corriente eléctrica estable que garantice su adecuado funcionamiento (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008). En tal sentido, para minimizar la probabilidad de pérdida de cepas, la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, 2010) recomienda usar al menos dos métodos de preservación diferentes.

La liofilización es un método de conservación que se utiliza con frecuencia para el almacenamiento de muestras biológicas. Consiste en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas para detener su metabolismo; y así, poder ser

conservadas en condiciones de refrigeración menos exigentes (18-20°C) por largos períodos de tiempo, lo que facilita considerablemente su almacenamiento y distribución (García et al., 2011).

Durante la liofilización, la etapa de congelación puede causar daños celulares por la formación de cristales de hielo y estrés osmótico. Para reducir estos efectos se emplean crioprotectores, compuestos que estabilizan la membrana celular y favorecen la formación de una estructura porosa que facilita la rehidratación del material liofilizado. El tipo de crioprotector es determinante en la supervivencia microbiana; entre los más utilizados se encuentra la leche descremada, la cual forma una capa protectora alrededor de las células y previene alteraciones estructurales durante el proceso (Alonso, S., 2016; Rodríguez-González et al., 2022; Zhang et al., 2020)

El presente trabajo se centró en evaluar el método de liofilización para la criopreservación de especies del género *Pseudomonas*, usando leche descremada como crioprotector, teniendo en cuenta la media general del conteo de las unidades formadoras de colonia pre- y post- liofilización.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del método de liofilización utilizando leche descremada como crioprotector en estirpes microbianas del género *Pseudomonas*.

2. Competencias de la pasantía

El pasante adquiere conocimientos sobre el cuidado de colecciones biológicas y la interpretación de resultados de viabilidad de cepas.

Desarrolla habilidades de cultivo de bacterias para el proceso de liofilización mediante el uso de crioprotectores.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

Se evaluaron 26 cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*, las cuales se encontraban crio-preservadas a -80°C en glicerol al 30% en la colección microbiana Cepario LMMA-UIS (Tabla 1). El origen de las cepas bacterianas es diverso: afloramientos rocosos, muestras de biopelículas y de agua de quebradas, muestras de agua de tuberías, y muestras de volcanes de lodos. La cepa tipo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®10145, fue incluida para comparación. La información detallada sobre la identificación taxonómica y origen geográfico de cada cepa está disponible en el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia. (<https://doi.org/10.15472/uq6pal>)

Tabla 1

Lista de cepas evaluadas del género Pseudomonas

Especie	No. UIS
<i>Ectopseudomonas mendocina</i>	UIS0202
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UIS0019, UIS0962, UIS0872, UIS0878
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	UIS1108, UIS1140
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UIS1081
<i>Pseudomonas fragi</i>	UIS0995, UIS1084, UIS1096, UIS1097, UIS1098
<i>Pseudomonas jilimensis</i>	UIS0351
<i>Pseudomonas mandelii</i>	UIS1110
<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	UIS0611
<i>Pseudomonas protegens</i>	UIS0547, UIS0576
<i>Pseudomonas putida</i>	UIS0887, UIS0960
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	UIS0647, UIS0648, UIS1172
<i>Pseudomonas sp.</i>	UIS0676
<i>Stutzeriomonas stutzeri</i>	UIS0315, UIS1320

Nota. No. UIS corresponde al número de registro de cada cepa en la colección Cepario LMMA-UIS.

3.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas bacterianas UIS0019, UIS0202, UIS0315, UIS0351 se usó el medio de cultivo Caldo Nutritivo (Merck, Darmstadt, Alemania); para las cepas restantes, usamos el medio Luria Bertani (Amresco, Solon, OH, E.U.). Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se distribuyeron a razón de 8 mL/tubos Falcon antes de su esterilización. Para preparar los medios solidificados se añadió 16g/L de agar. Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a 1 atm. Los medios que contenían agar fueron servidos inmediatamente luego de esterilización en cajas Petri a razón de 25 mL/caja y se dejaron solidificar sobre una superficie nivelada. Antes de su uso, todos los medios fueron incubados durante 24 horas para comprobación de su pureza en una incubadora microbiológica MLW (Zscheppelin, Saxony, Alemania).

3.3 Reactivación y comprobación de la pureza de las cepas

Las cepas se reactivaron transfiriendo el contenido de los crio-viales a los tubos Falcon que contenían el medio líquido correspondiente a cada una. Cada tubo se incubó en una incubadora microbiológica MLW (Zscheppelin, Saxony, Alemania) a una temperatura de 37 °C durante 24 a 48 horas. La turbidez del medio se consideró indicativa de crecimiento bacteriano. Se desarrollaron tinciones de Gram a cada cepa bacteriana para verificar su pureza. Los cultivos se sembraron en medio sólido por estría de agotamiento con el fin de comprobar la forma y la uniformidad de las colonias, para posteriormente aislar una colonia a un tubo Falcon.

3.4 Liofilización

Las cepas anteriormente aisladas, se cultivaron por extensión en medios sólidos, durante 48 horas a partir de un inóculo (0.5 mL). Posteriormente, se cosechó toda la biomasa disponible en la caja Petri usando hisopos estériles, crecida siempre en el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones experimentales, para después ser transferida a un tubo Falcon que contenía 6 mL de leche descremada al 10% según lo indicado por Morgan et al., (2006). La pureza del cultivo se comprobó mediante tinción de Gram y la concentración de la suspensión a liofilizar (pre-liofilización) se determinó mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en cajas Petri, las cuales se sembraron con diluciones seriadas de la suspensión.

La fase de congelación de la suspensión celular, se inició reposando esta suspensión durante 60 minutos, y posteriormente, esta se distribuyó en los crio-viales a razón de 0,7 mL/crio-vial; los cuales se congelaron durante 2 horas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una nevera Thermo Scientific™ TSE Series (Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finlandia). Los crio-viales fueron entonces sometidos a un proceso de secado por sublimación usando un liofilizador TFD 8501 (Ilshin Bio Base, Seúl, República de Corea), operado en modo manual a una temperatura de $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$, iniciando con una presión 999 mTorr hasta alcanzar una de 5 mTorr. A partir de este momento, se contaron 5 horas para completar el proceso de secado. En nuestro caso, cada corrida incluyó un total de 15 crio-viales; por tanto, se requirieron 5 horas (300 minutos). La capacidad total de las cámaras de liofilizador es de 72 crio-viales. Dado que se requerirían aproximadamente 20 minutos para el secado efectivo de cada crio-vial, el proceso con equipo lleno, tomaría 24 horas.

3.5 Determinación de la carga microbiana pre- y post- liofilización

En cajas Petri, se prepararon diluciones seriadas hasta el factor 10^{-10} utilizando una solución salina al 0,8% como diluyente. De cada dilución se sembraron 0,1 mL por extensión en cajas Petri con el medio de cultivo correspondiente, las cuales se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se efectuó el conteo de colonias para determinar los valores promedios de células viables. Cada dilución produce un dato (replicas internas) de conteo UFC de la biomasa, obteniendo al menos tres datos para calcular el promedio del conteo del número de colonias por caja Petri, multiplicando por el factor de dilución en cada caso. Este procedimiento se realizó tanto antes y después del proceso de liofilización. Para el recuento post-liofilización, se requirió hidratar las muestras liofilizadas con 0,7 mL de agua destilada estéril (Prakash et al., 2013), luego se prepararon las diluciones seriadas, se sembraron y, por último, se desarrolló el conteo de UFC. Todos los datos fueron organizados en una plantilla Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2021) y su representación gráfica fue desarrollada usando el paquete de librerías ggplot2, tidy, dplyr y scales (Wickham et al., 2023) en la plataforma R (Rstudio team, 2020).

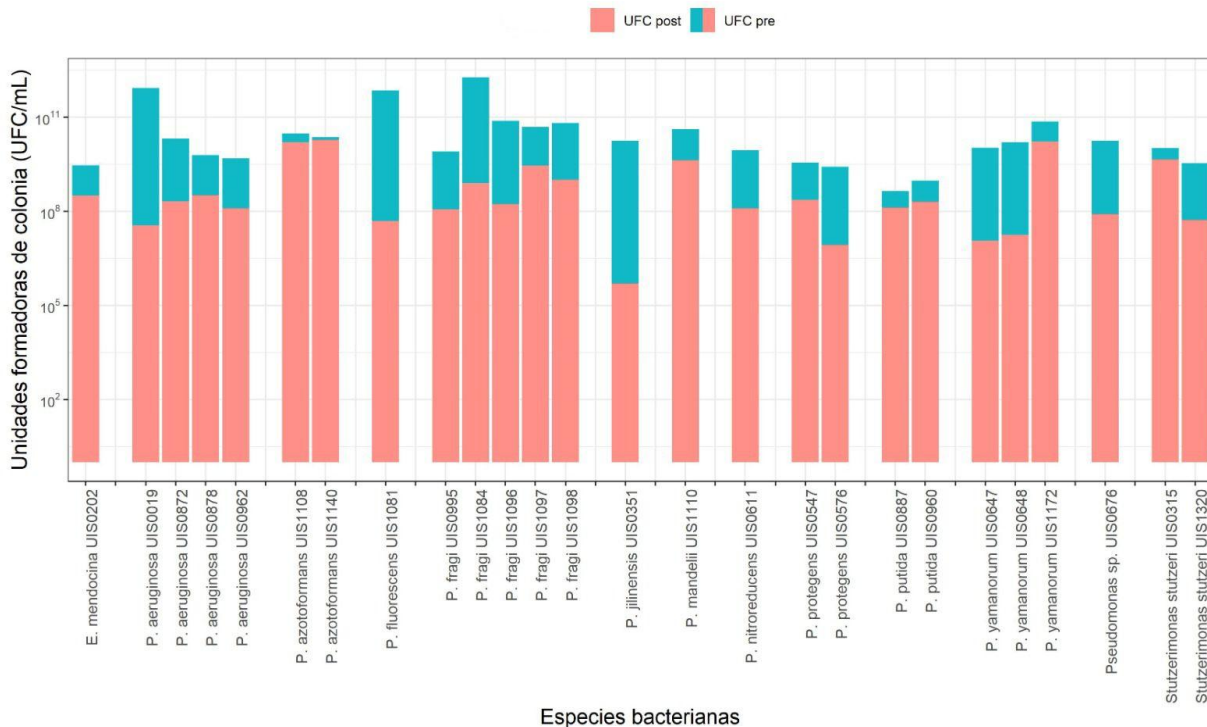
4. Resultados y Discusión

Se evaluó el método de liofilización para la crio-preservación de estirpes microbianas del género *Pseudomonas*, usando leche descremada al 10% como crio-protector. La carga microbiana original (pre-liofilización) de las cepas estudiadas estuvo entre 4.40×10^8 y 1.86×10^{12} UFC/mL, en correspondencia con lo observado por Miyamoto-Shinohara et al., (2000). Estos autores indicaron que, para la especie de *P. mandelii*, son requeridos valores de viabilidad pre-liofilización

entre 10^6 – 10^{10} UFC/mL, para mantener crio-preservados durante 20 años. Vale aclarar que, la razón para conservar altas concentraciones celulares se basa en la premisa de que una fracción importante de las células mueren durante el almacenamiento a largo plazo, pero un número suficiente sobrevive para permitir la continuidad de la cepa.

Figura 1

Media general de las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) de las cepas bacterianas evaluadas.



Nota. Histograma de barras apiladas con los valores de la media general de las unidades formadoras de colonia pre- y post- liofilización por especie del género *Pseudomonas*.

De las 26 cepas evaluadas, 18 (69%) mostraron valores de viabilidad post-liofilización superiores a 10^8 UFC/mL (Figura 1), indicando valores adecuados de tolerancia al proceso de liofilización (Miyamoto-Shinohara et al., 2000; Abadias et al., 2001; Morgan et al., 2006). Estos valores representaron un valor promedio de porcentajes de viabilidad del 11,62% (Apéndice A). Basado en tales porcentajes de viabilidad, se ha indicado que un valor del 0,1 % de la población celular original, constituye una carga celular suficiente para sobrevivir el proceso de liofilización (Bozoglu et al., 1987). En tal sentido, nuestros porcentajes de viabilidad fueron adecuados.

Un aspecto relevante a considerar es que la respuesta a la liofilización varió según la especie, e incluso, entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, los conteos celulares post-liofilización en las cepas de las especies *P. aeruginosa* (3.5×10^7 UFC/mL), *P. fluorescens* (4.85×10^7 UFC/mL) y *P. jilinensis* (5.0×10^5 UFC/mL), resultaron entre los más bajos. En tales casos, la combinación de la leche descremada con otros criopreservantes disacáridos (Ej: sacarosa y trehalosa), podrían mejorar la respuesta de estas especies microbianas al proceso de liofilización como indican previos estudios (Palmfeldt et al., 2003; Muñoz et al., 2006; Peiren et al., 2015; Quintero-Rodríguez et al., 2023). Por el contrario, los conteos de especies como *P. azotoformans*, *P. putida* y *P. fragi*, no fueron afectados de manera importante por la liofilización. Los resultados obtenidos para las especies *P. fluorescens* y *P. protegens* UIS0576, soportan previos hallazgos con estas especies (Stephan et al. 2016).

Por otra parte, las cepas de la especie *P. aeruginosa* y *P. yamanorum*, mostraron conteos de viabilidad post-liofilización notablemente distintos. Esta variabilidad indica que la respuesta al proceso de desecación no es uniforme entre cepas. Se ha indicado, que tal variabilidad es

consecuencia de factores intrínsecos como: niveles diferentes de resistencia a la presión osmótica, de formación de hielo intracelular, y pérdida de integridad celular (Heckly 1961; Prakash et al., 2013). Heckly et al., (1985) afirma que en la fase logarítmica tardía o estacionaria de cultivos de *P. fluorescens*, son menos sensibles al proceso de liofilización que en las células jóvenes. Por el contrario, Bisutti et al., (2015) indicaron que la tasa de supervivencia después de la liofilización de *P. putida* fue mayor para las células en la fase estacionaria que para las células en la fase logarítmica. Por tanto, este sería otro factor a considerar para obtener resultados exitosos durante su liofilización.

En general, nuestros resultados muestran que el método de liofilización usando la leche descremada como crio-preservante es adecuado para el mantenimiento a largo plazo de cepas del género *Pseudomonas* de la colección de cultivos “Ceparío LMMA-UIS”. El método de liofilización permite conservar las cepas en condiciones de refrigeración poco exigentes (18-20°C), resultando en una alternativa al método de crio-preservación en glicerol que requiere del uso de ultra-congeladores (-80°C) con suministro de corriente eléctrica estable. El establecimiento del método de liofilización, se alinea con las exigencias para el registro internacional de mediano plazo de la colección.

Por último, se resalta que el uso de la leche descremada al 10% es útil para proteger a las células de la congelación y deshidratación durante la liofilización. El método, al eliminar el agua de la célula, prolonga de manera importante la viabilidad en el tiempo de los microorganismos (Malik et al.,1987). La leche descremada como crio-protector tiene propiedades que reaccionan con la proteína estructural bacteriana, formando una biopelícula en la superficie de las bacterias.

(Zhang et al., 2020). Sin embargo, ningún criopreservante por sí solo es infalible, por lo que, el uso combinado de criopreservantes es una alternativa en el caso de microorganismos más sensibles al proceso de liofilización (Carvalho et al., 2004; Morales-García et al., 2010).

5. Conclusiones

En general, el método de liofilización en leche descremada resultó efectivo para la preservación de especies *Pseudomonas*, mostrando conteos de viabilidad post-liofilización superiores a 10^8 UFC/mL; excepto para las cepas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. jilinensis*. En tal sentido, este método se presenta como una alternativa complementaria a la criopreservación (-80°C) en glicerol para el mantenimiento de la colección de cultivo Cepario LMMA-UIS.

6. Recomendaciones

Se recomienda probar combinaciones del crioprotector leche descremada con azúcares para mejorar su rendimiento de preservación de cepas de las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. jilinensis*. Teniendo en cuenta las diferencias inter-específicas entre las especies de *Pseudomonas*, es posible que los requerimientos térmicos y nutricionales influyan en su tolerancia al proceso de liofilización. Por lo tanto, para estudios futuros para aquellas cepas que presentan baja viabilidad post-liofilización se recomienda evaluar condiciones de crecimiento alternativas.

Referencias Bibliográficas

- Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. (CPN, CNIC) , (CQF).
- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J. y Viñas, I. (2001). Efecto de la liofilización y los protectores en la viabilidad de la levadura de biocontrol *Candida sake*. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos* 65, 173–182. doi:10.1016/s0168-1605(00)00513-4 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00513-4)
- Alonso, S. (2016). Novel preservation techniques for microbial cultures. In *Novel food fermentation technologies* (pp. 7-33). Cham: Springer International Publishing. DOI <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6>
- Bisutti, I. L., Hirt, K., & Stephan, D. (2015). Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153. *Biocontrol Science and Technology*, 25(11), 1269-1284. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1044498>
- Bozoğlu, T. F., Özilgen, M., & Bakir, U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and microbial technology*, 9(9), 531-537. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90082-2)
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International dairy journal*, 14(10), 835-847. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001>
- De Vero, L., Boniotti, M. B., Budroni, M., Buzzini, P., Cassanelli, S., Comunian, R., & Varese, G. C. (2019). Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the italian network of culture collections. *Microorganisms*,

7(12), 685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>

Graphics. R package version 3.4.4. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2> Wickham, H., & Seidel, D. (2023).

García, M. D., López-Coronado, J. M., López-Ocana, L., & Uruburu Fernández, F.(2011). Preservation of microbial strains in the wine industry.

Heckly, R. J. (1961). Preservation of bacteria by lyophilization. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 3, pp. 1-76). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70506-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70506-9)

Microsoft Corporation. (2021). Microsoft Excel for Microsoft 365 (Versión 16.0) [Software de computadora]. Microsoft. <https://www.microsoft.com>

Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A & Ramos JL (2006) Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 472-477. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.472-477.2006>

Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., & Komatsu, Y. (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41(3), 251-255. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282>

McCluskey, K. (2017). A review of living collections with special emphasis on sustainability and its impact on research across multiple disciplines. *Biopreservation and biobanking*, 15(1), 20-30. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0066>

Malik, K. A., & Claus, D. (1987). Bacterial culture collections: their importance to biotechnology and microbiology. *Biotechnology and Genetic engineering reviews*, 5(1), 137-198. <https://doi.org/10.1080/02648725.1987.10647837>

- Morales-García, Y. E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R. D., Pérez-y-Terrón, R., & Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2), 11-29.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Rodríguez, S., González, L., Shimada, A., & Mora, O. (2022). In-vitro evaluation of three conservation methods of probiotics from 42-day-old tropical calves. *Asian Res J Agric*,
- Palmfeldt, J., Rådström, P., & Hahn-Hägerdal, B. (2003). Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 47(1), 21-29. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00065-8)
- Peiren, J., Buyse, J., De Vos, P., Lang, E., Clermont, D., Hamon, S., ... & Arahall, D. R. (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(8), 3559-3571
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS microbiology letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Quintero-Rodríguez, M. P., Montoya-Arango, D., Restrepo-Posada, D. C., & González-Gil, D. M. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota colombiana*, 24(2). <https://doi.org/10.21068/2539200x.1127>

Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological control*, 94, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>

World Federation for Culture Collections. (2010). Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms (3rd ed.). <https://wfcc.info/guideline>

Zhang, Z., Yu, Y. X., Wang, Y. G., Wei, X. X., Liao, M. J., Rong, X. J., & Chen, J.(2020). Development of a new protocol for freeze-drying preservation of *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and its protective effect on other marine bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 44, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.12.006>

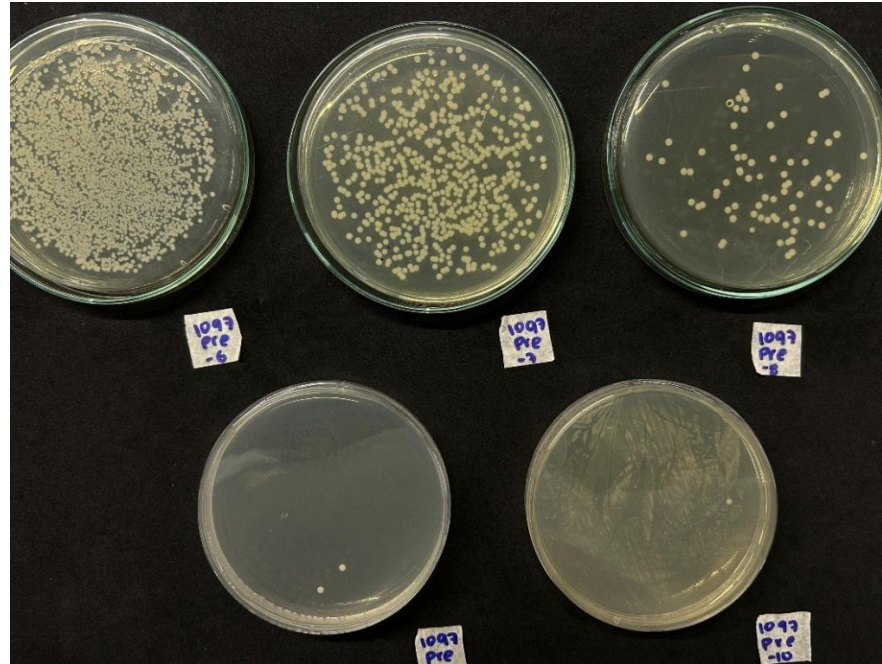
Apéndices

Apéndice A. Valores de la media general de las unidades formadoras de colonia pre- y post-liofilización y porcentaje de supervivencia (%) por especie del género *Pseudomonas*.

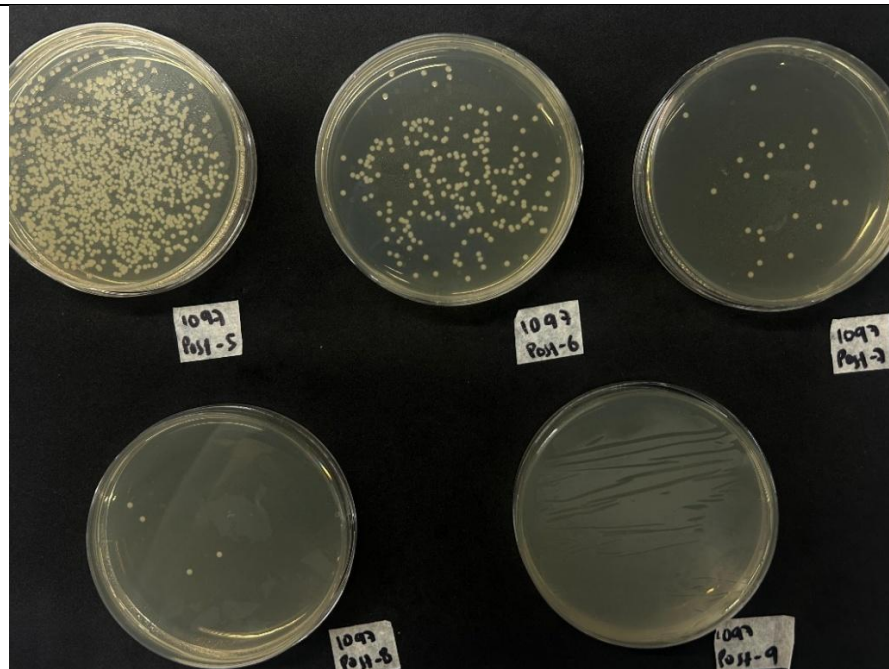
Especie	No. UIS	UFC pre	UFC post	Porcentaje supervivencia
<i>E. mendocina</i>	UIS0202	2.95E+09	3.15E+08	10.68
<i>P. aeruginosa</i>	UIS0019	8.53E+11	3.50E+07	0.00
<i>P. aeruginosa</i>	UIS0872	2.07E+10	2.05E+08	0.99
<i>P. aeruginosa</i>	UIS0878	6.27E+09	3.30E+08	5.27
<i>P. aeruginosa</i>	UIS0962	4.85E+09	1.23E+08	2.54
<i>P. azotoformans</i>	UIS1108	3.00E+10	1.58E+10	52.61
<i>P. azotoformans</i>	UIS1140	2.33E+10	1.93E+10	82.92
<i>P. fluorescens</i>	UIS1081	6.99E+11	4.85E+07	0.01
<i>P. fragi</i>	UIS0995	8.18E+09	1.16E+08	1.41
<i>P. fragi</i>	UIS1084	1.86E+12	7.91E+08	0.04
<i>P. fragi</i>	UIS1096	7.68E+10	1.73E+08	0.22
<i>P. fragi</i>	UIS1097	4.81E+10	2.82E+09	5.87
<i>P. fragi</i>	UIS1098	6.62E+10	1.00E+09	1.52
<i>P. jilimensis</i>	UIS0351	1.75E+10	5.00E+05	0.00
<i>P. mandelii</i>	UIS1110	4.20E+10	4.30E+09	10.25
<i>P. nitroreducens</i>	UIS0611	8.67E+09	1.25E+08	1.45
<i>P. protegens</i>	UIS0547	3.54E+09	2.30E+08	6.50
<i>P. protegens</i>	UIS0576	2.64E+09	8.50E+06	0.32
<i>P. putida</i>	UIS0887	4.40E+08	1.31E+08	29.77
<i>P. putida</i>	UIS0960	9.57E+08	2.00E+08	20.94
<i>P. yamanorum</i>	UIS0647	1.05E+10	1.15E+07	0.11
<i>P. yamanorum</i>	UIS0648	1.59E+10	1.75E+07	0.11
<i>P. yamanorum</i>	UIS1172	7.26E+10	1.69E+10	23.32
<i>Pseudomonas sp.</i>	UIS0676	1.78E+10	8.10E+07	0.46
<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	UIS0315	1.03E+10	4.44E+09	43.31
<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	UIS1320	3.45E+09	5.32E+07	1.54
				=11.62%

Apéndice B. Ilustración del ensayo de diluciones seriadas para el conteo UFC.


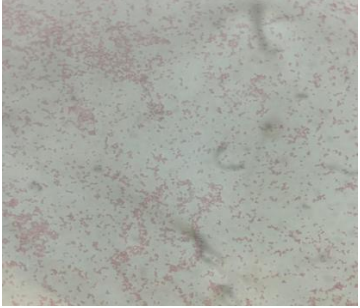



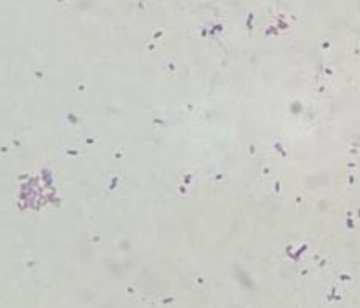

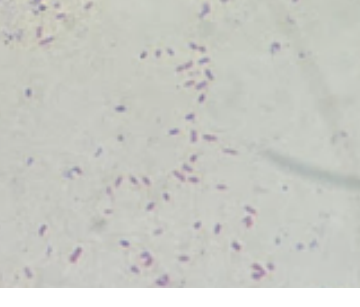
UIS1097
Pre-liofilización

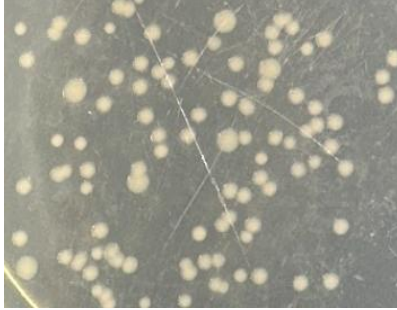
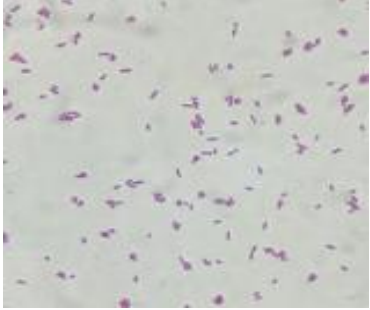

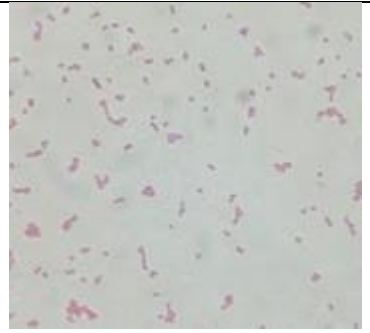
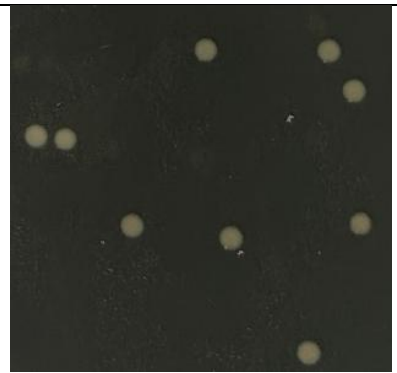
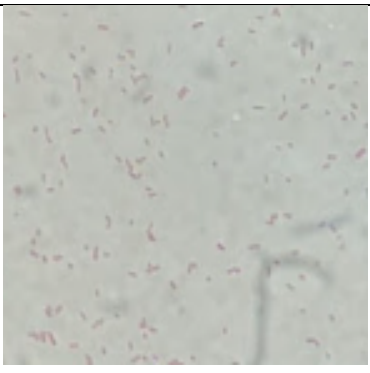
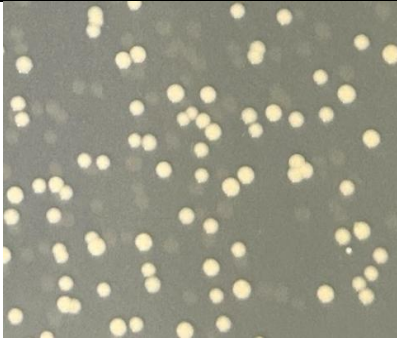
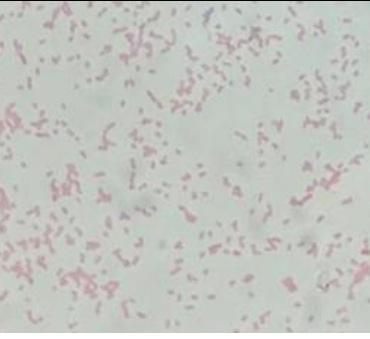


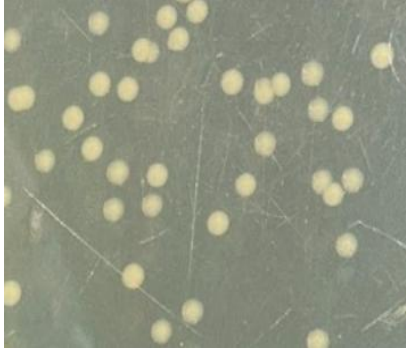
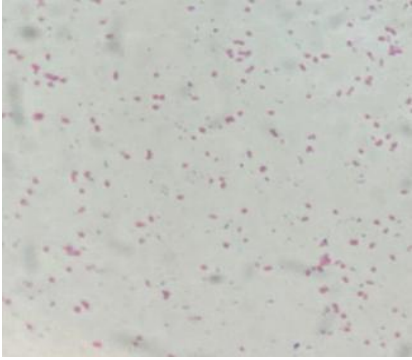

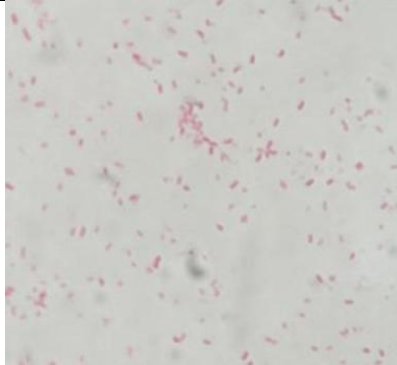
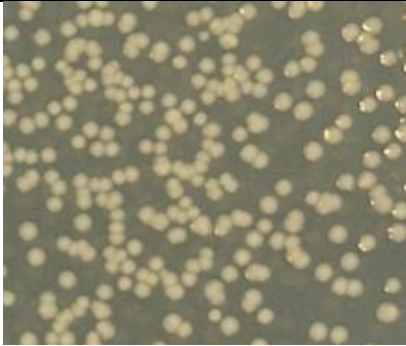

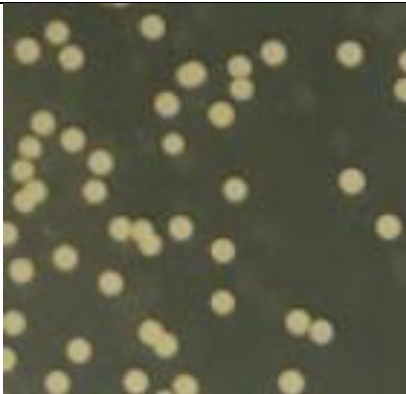
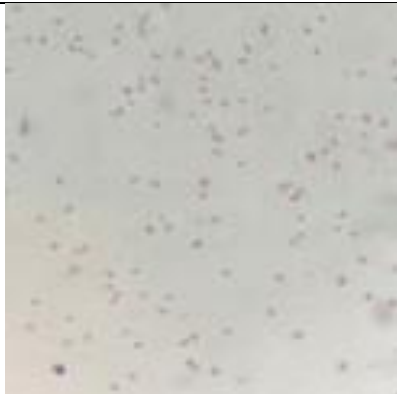
UIS1097
Post-liofilización

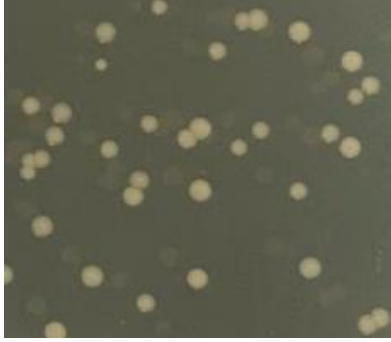
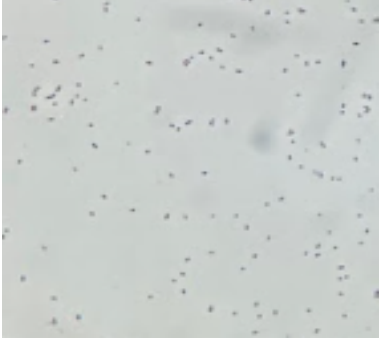

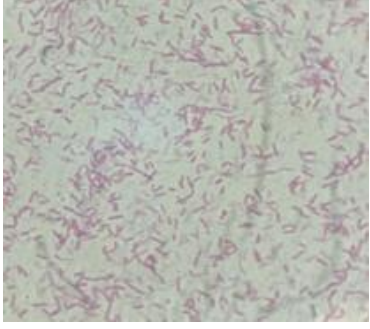

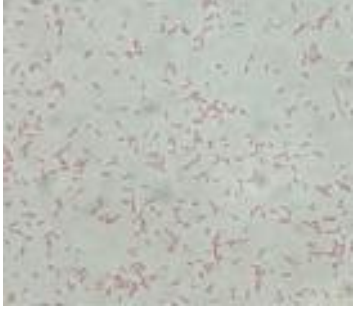

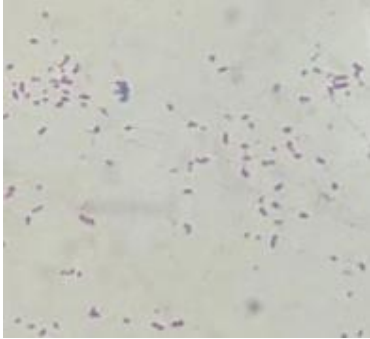



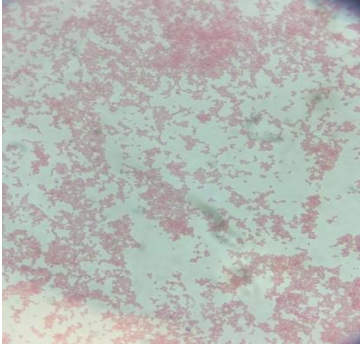

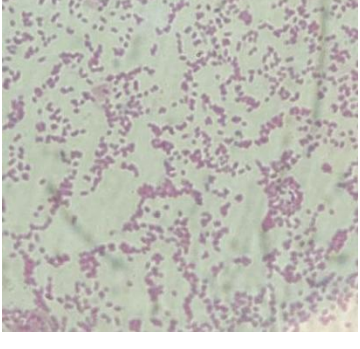

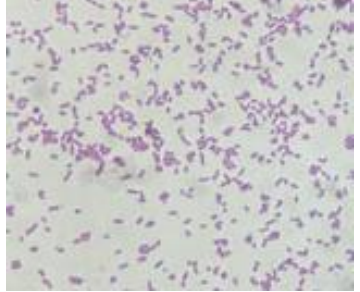

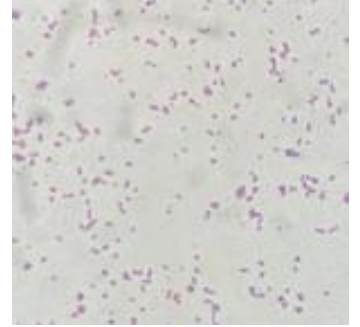
Apéndice C. Registro fotográfico a nivel macroscópico (colonias) y microscópico (tinción diferencial Gram) de las cepas del género *Pseudomonas*.




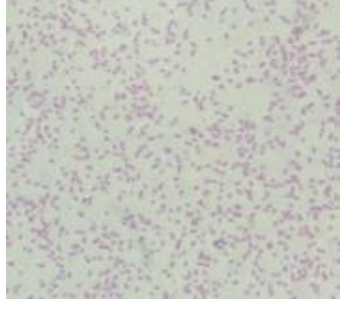

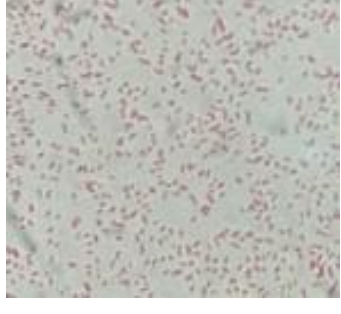

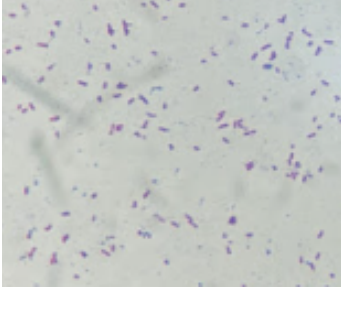
Cepa	Registro macroscópico	Registro microscópico
<i>E. mendocina</i> UIS0202		
<i>P. aeruginosa</i> UIS0019		
<i>P. aeruginosa</i> UIS0872		
<i>P. aeruginosa</i> UIS0878		


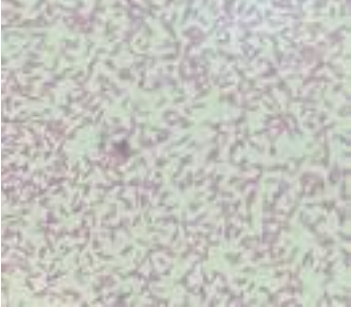
<i>P. aeruginosa</i> UIS0962		
<i>P. azotoformans</i> UIS1108		
<i>P. azotoformans</i> UIS1140		
<i>P. fluorescens</i> UIS1081		

<i>P. fragi</i> UIS0995		
<i>P. fragi</i> UIS1084		
<i>P. fragi</i> UIS1096		
<i>P. fragi</i> UIS1097		

<i>P. fragi</i> UIS1098		
<i>P. jilinensis</i> UIS0351		
<i>P. mandelii</i> UIS1110		
<i>P. nitroreducens</i> UIS0611		

<i>P. protegens</i> UIS0547		
<i>P. protegens</i> UIS0576		
<i>P. putida</i> UIS0887		
<i>P. putida</i> UIS0960		

<i>P.</i> <i>yamanorum</i> UIS0647		
<i>P.</i> <i>yamanorum</i> UIS0648		
<i>P.</i> <i>yamanorum</i> UIS1172		
<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> UIS0676		

<i>Stutzerimonas</i> <i>stutzeri</i> UIS0315		
<i>Stutzerimonas</i> <i>stutzeri</i> UIS1320	