

Collection of microorganisms with potential as additives for animal nutrition at the Institute of Animal Science

Colección de microorganismos con potencialidades como aditivos para la nutrición animal del Instituto de Ciencia Animal

Areadne Sosa, Niurca González, Yaneisy García, Yoandra Marrero, Elaine Valiño, Juana Galindo, Dailyn Sosa, Maryen Alberto, Dayamí Roque, Nereida Albelo, Laura Colomina and Onidia Moreira

Instituto de Ciencia Animal

Apdo 24. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: asosa@ica.co.cu

The supply of viable, authentic and secure microbial cultures is essential for obtaining agricultural products through biotechnology. The objective of this study was to establish, at the Institute of Animal Science, the methodology for organizing and managing the collection of microorganisms with potential as additives in animal nutrition. The establishment of the collection was developed in three stages: design of collection structure, definition of conservation methods for each type of microorganism and preparation of documents. Guidelines of the World Federation for Culture Collections, biological safety regulations, requirements of quality systems and requirements for lab competence were consulted. The establishment of a collection of microorganisms at the Institute of Animal Science, with appropriate conservation methods for each microbial group, guarantees the availability of strains for teaching, research and obtaining additives for animal feed.

Key words: *culture collection, conservation of microorganisms, microbial additives*

The use of microorganisms for research or production is not possible without the supply of viable, authentic and secure cultures. Culture collections are responsible for preserving microbial sources and guaranteeing their availability. In these, strains of interest are conserved by suitable methods in order to maintain purity, viability and genetic stability (Smith 2014 and Simões *et al.* 2016).

The World Federation for Culture Collections (WFCC) is the organization that represents the culture collections and draws up the guidelines for its establishment and organization (WFCC 2010 and Wu *et al.* 2017). There are also regional organizations such as the Latin American Federation for Culture Collections (FELACC), founded in 2004 with the aim of establishing actions of interest for Latin American and Caribbean collections, and promoting the *ex situ* preservation of microbial diversity in the region (Floccari 2005 and FELACC 2015).

In Cuba, there are more than 35 collections of microbial cultures from different organisms, most of them associated with the Section of Cuban Collections of Microbial Cultures and other biological materials,

En la obtención de productos agropecuarios por vías biotecnológicas es fundamental el suministro de cultivos microbianos viables, auténticos y seguros. El objetivo del presente trabajo fue establecer en el Instituto de Ciencia Animal la metodología para la organización y el manejo de la colección de microorganismos con potencialidades como aditivos en la nutrición animal. El establecimiento de la colección se desarrolló en tres etapas: diseño de la estructura de la colección, definición de los métodos de conservación para cada tipo de microorganismo y elaboración de la documentación. Se consultaron los lineamientos de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivo, las regulaciones de seguridad biológica, los requisitos de los sistemas de calidad y los requisitos para la competencia de los laboratorios. El establecimiento de la colección de microorganismos del Instituto de Ciencia Animal, con métodos de conservación adecuados para cada grupo microbiano, garantiza la disponibilidad de cepas para la docencia, investigación y la obtención de aditivos para la alimentación animal.

Palabras clave: *colección de cultivos, conservación de microorganismos, aditivos microbianos*

El empleo de microorganismos para la investigación o la producción no es posible sin el suministro de cultivos viables, auténticos y seguros. Las colecciones de cultivo son las encargadas de preservar las fuentes microbianas y garantizar su disponibilidad. En estas se conservan las cepas de interés por métodos adecuados para que mantengan la pureza, viabilidad y estabilidad genética (Smith 2014 y Simões *et al.* 2016).

La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC, por sus siglas en inglés) es la organización que representa las colecciones de cultivo y traza los lineamientos para su establecimiento y organización (WFCC 2010 y Wu *et al.* 2017). También existen organizaciones regionales como la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC), cuya fundación tuvo lugar en 2004 con el objetivo de establecer acciones de interés para las colecciones de América Latina y el Caribe, y promover la preservación *ex situ* de la diversidad microbiana en la región (Floccari 2005 y FELACC 2015).

En Cuba, existen más de 35 colecciones de cultivos microbianos de diferentes organismos, en su mayoría asociadas a la Sección de Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos y otros materiales biológicos, constituida en

constituted in 2002 (Iglesias *et al.* 2006) and belonging to the Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba (ATAC). The majority of these collections are related to human health, food industry and environmental control (Del Puerto *et al.* 2009, Iglesias *et al.* 2010 and Del Puerto-Sardiñas *et al.* 2016). In the agroindustry, the existing collections guarantee the supply of strains for the production of biofertilizers, biological controls and vaccines and antibodies for animal health (Montes de Oca *et al.* 2008).

Animal feed is a concern at national level due to the lack of raw materials and its high costs. Therefore, alternatives are looked for and, within these, one of the most novel is the production of food and additives through biotechnology, where microorganisms or their products are used as active ingredients (García and García 2015 and Galindo *et al.* 2017). Isolation, identification, characterization and conservation of these microorganisms become fundamental links for obtaining agricultural products through biotechnological ways.

The Instituto de Ciencia Animal (ICA) has collections of microorganisms with potential for use in animal feed. However, the accelerated development of biotechnology in the agricultural sector and the isolation of new strains requires the organization of existing collections in a single collection and the implementation of procedures to guarantee their proper functioning. The objective of this study was to establish the methodology for organization and management of the collection of microorganisms with potential as additives in animal nutrition at the Instituto de Ciencia Animal.

Materials and Methods

The establishment of the collection of microbial cultures from ICA was developed in three stages, which included the design of the collection structure, definition of preservation methods for each type of microorganisms and the preparation of documents.

Guidelines of the World Federation for Culture Collections (WFCC 2010), biological safety regulations (CE 1999 and CITMA 2000, 2004), requirements of quality systems (NC ISO 9001: 2015) and requirements for lab competences (NC-ISO/IEC 17025: 2006) were taken into account for the organization and function of this collection.

Collection design. The structure design of the collection included the selection of biological material to be preserved, gathering of existing information of each strain and definition of sub-collections. The selection criteria were the proper identification of microorganisms and the results that demonstrated their potential for increasing animal productivity. These principles were established as basis for policies to accept new strains that join the collection.

Microorganism conservation. For a short-term conservation, the method of periodic cultivation was defined for all the strains. As a long-term conservation

2002 (Iglesias *et al.* 2006) y perteneciente a la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba (ATAC). La mayoría de estas colecciones están vinculadas a la salud humana, la industria alimenticia y el control ambiental (Del Puerto *et al.* 2009, Iglesias *et al.* 2010 y Del Puerto-Sardiñas *et al.* 2016). En la agroindustria las colecciones existentes garantizan el suministro de cepas para la producción de biofertilizantes, controles biológicos y vacunas y anticuerpos para la salud animal (Montes de Oca *et al.* 2008).

La alimentación animal constituye preocupación a nivel nacional por la carencia de materias primas y sus elevados costos. Por ello, se buscan alternativas y dentro de estas una de las más novedosas es la producción de alimentos y aditivos por vía biotecnológica, donde se utilizan los microorganismos o sus productos como principios activos (García y García 2015 y Galindo *et al.* 2017). El aislamiento, identificación, caracterización y conservación de estos microorganismos se convierten en eslabones fundamentales para la obtención de productos agropecuarios por vías biotecnológicas.

El Instituto de Ciencia Animal (ICA) cuenta con colecciones de microorganismos con potencialidades de uso en la alimentación animal. Sin embargo, el acelerado desarrollo de la biotecnología en la rama agropecuaria y el aislamiento de nuevas cepas, exige la organización de las colecciones existentes en una colección única y la implementación de procedimientos que garanticen su correcto funcionamiento. El objetivo del presente trabajo fue establecer en el Instituto de Ciencia Animal la metodología para la organización y el manejo de la colección de microorganismos con potencialidades como aditivos en la nutrición animal.

Materiales y Métodos

El establecimiento de la Colección de Cultivos Microbianos del ICA se desarrolló en tres etapas, que comprendieron el diseño de la estructura de la colección, la definición de los métodos de conservación para cada tipo de microorganismo y la elaboración de la documentación.

Para la organización y operación de esta colección se utilizaron los lineamientos de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC 2010), las regulaciones de seguridad biológica (CE 1999 y CITMA 2000, 2004), los requisitos de los sistemas de calidad (NC ISO 9001: 2015) y los requisitos para la competencia de los laboratorios (NC-ISO/IEC 17025: 2006).

Diseño de la colección. El diseño de la estructura de la colección comprendió la selección del material biológico a conservar, la recopilación de la información existente de cada cepa y la definición de las subcolecciones. Se utilizaron como criterios de selección la correcta identificación del microorganismo y los resultados que demostraran su potencial para incrementar la productividad animal. Estos principios se establecieron como base en las políticas para aceptar nuevas cepas que se integran a la colección.

Conservación de microorganismos. Para la conservación a corto plazo se definió el método de las

method, freezing was established and three work methodologies were designed, taking into account the type of organism:

a) Conservation of acid lactic bacteria by freezing with yeast extract milk and glycerol as cryoprotectant (Saab *et al.* 2001 and Belmonte *et al.* 2008).

b) Conservation of filamentous fungi by freezing with glycerol at 10 % (López-Lastra *et al.* 2001 and Gutiérrez *et al.* 2017).

c) Conservation of yeasts by freezing with glycerol at 20% (Bond 2007 and Kurtzman *et al.* 2011).

Document preparation. Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) for a proper functioning of microorganism collection were written according to literature specialized in the subject and general procedures of the Sistema de Gestión de la Calidad from Instituto de Ciencia Animal.

A catalog with the collection was prepared in order to promote product and services derived from this collection. For designing, structuring and organizing content, searches of information in catalogues with similar objectives were carried out.

Results and Discussion

Collection design. It was defined that the collection would be composed by three sub-collections: yeasts, acid lactic bacteria and filamentous fungi (figure 1).

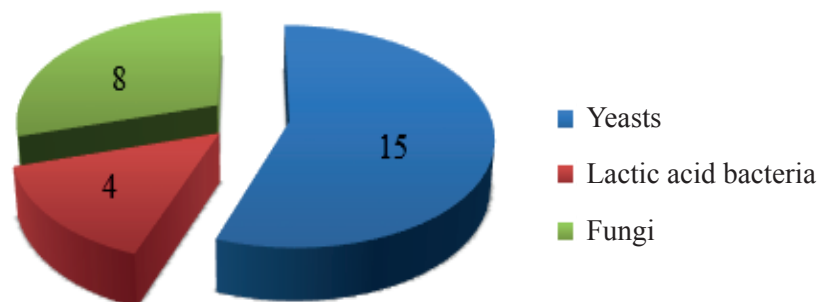


Figure 1. Composition of the collection of microorganisms from ICA

Yeast sub-collection (table 1) is composed by rumen isolated strains of cow consuming a yeast-enriched fermented product (Marrero *et al.* 2005). All yeasts were identified by biochemical and molecular tests (Marrero *et al.* 2011, 2013).

Preserved strains stimulate ruminal fermentation in animals consuming diets with high fiber (Marrero *et al.* 2012, 2014, 2015). Its effect was demonstrated in the reduction of methanogenic bacteria populations and methane production (Galindo *et al.* 2010). With its inclusion on ruminant diets, there was an increase of bacteria and cellulolytic fungi (Marrero *et al.* 2006).

Fungi sub-collection (table 2) is composed by seven strains, high producers of lignocellulolytic enzymes isolated from contaminated plant materials and a strain

siembras periódicas para todas las cepas. Como método de preservación a largo plazo se estableció la congelación y se diseñaron tres metodologías de trabajo, al tener en cuenta el tipo de microorganismo:

a) Conservación de bacterias ácido lácticas por congelación con leche extracto de levadura (LEL) y glicerol como crioprotector (Saab *et al.* 2001 y Belmonte *et al.* 2008).

b) Conservación de hongos filamentosos por congelación con glicerol al 10 % (López-Lastra *et al.* 2001 y Gutiérrez *et al.* 2017).

c) Conservación de levaduras por congelación con glicerol al 20 % (Bond 2007 y Kurtzman *et al.* 2011).

Elaboración de la documentación. Los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para la correcta operación de la colección de microorganismos se redactaron sobre la base de la bibliografía especializada en la temática y los procedimientos generales del Sistema de Gestión de la Calidad del Instituto de Ciencia Animal.

Se elaboró el catálogo de la colección con el objetivo de promocionar los productos y servicios que derivan de la colección. Para diseñar, estructurar y organizar el contenido se realizaron búsquedas de información que mostraron catálogos con objetivos similares.

Resultados y Discusión

Diseño de la colección. Se definió que la colección estaría formada por tres subcolecciones: levaduras,

bacterias ácido lácticas y hongos filamentosos (figura 1).

La subcolección de levaduras (tabla 1) está compuesta por cepas aisladas del rumen de vacas que consumieron un producto fermentado rico en levaduras (Marrero *et al.* 2005). Todas las levaduras se identificaron por pruebas bioquímicas y moleculares (Marrero *et al.* 2011, 2013).

Las cepas conservadas estimulan la fermentación ruminal en animales que consumen dietas con alto contenido en fibra (Marrero *et al.* 2012, 2014, 2015). Se demostró su efecto en la reducción de las poblaciones de bacterias metanógenicas y la producción de metano (Galindo *et al.* 2010). Con su inclusión en la dieta de rumiantes se observaron aumento de bacterias y hongos celulolíticos (Marrero *et al.* 2006).

La subcolección de hongos (tabla 2) la conforman siete cepas altas productoras de enzimas lignocelulolíticas

Table 1. Yeast strains from ICA collection

Strain	Molecular identification	Access No. to the GenBank
13	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894136
15	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894141
17	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894137
22	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894139
27	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894143
28	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894145
32	<i>Pichia guilliermondii</i>	JF894142
23	<i>Issatchenkia orientalis</i>	JF894138
24	<i>Issatchenkia orientalis</i>	JF894147
29	<i>Issatchenkia orientalis</i>	JF894140
33	<i>Issatchenkia orientalis</i>	JF894146
25	<i>Candida tropicalis</i>	JF894135
18R	<i>Rodotorula mucilaginosa</i>	JF894148
L/25/7/13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
FL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

Table 2. Filamentous fungi strains from ICA collection

Strain	Molecular identification	Access No. to the GenBank
M5-2	<i>Trichoderma viride</i>	KY977981
N7	<i>Trichoderma sp.</i>	KY486926
L7	<i>Curvularia kusanoi</i>	KY795957
G	<i>Curvularia lunata</i>	KY794910
Basidio	<i>Hypoxyton sp.</i>	KY486927
EC623	<i>Neurospora sp</i>	KY977980
6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KY977979
J1	<i>Aspergillus niger</i>	KY486928
Güira	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KY486929
H/6.28.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	

of *Aspergillus oryzae* from the collection of Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

The use of these microorganisms in fermentative processes favors degradation of substratum and increases the availability of nutrients within the food (Valiño *et al.* 2004, 2015a,b). In the case of *A. oryzae*, it was demonstrated its effect on stimulation of ruminal fermentation of fiber substrata (Sosa *et al.* 2010b). With its inclusion, populations of cellulolytic and total bacteria and rumen fungi increased, and, consequently, concentrations of short chain fatty acids also increased (Sosa *et al.* 2010a).

Finally, the sub-collection of acid lactic bacteria (table 3) if composed by strains isolated from the gastrointestinal tract of broilers fed a diet based on soy bean and maize (García-Hernández *et al.* 2012). All isolates were identified by biochemical tests and sequencing of ribosomal RNA 16S gen (García-Hernández *et al.* 2016).

The inclusion of these microorganisms on the diets of

aisladas de materiales vegetales contaminados y una cepa de *Aspergillus oryzae* procedente de la colección del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

El empleo de estos microorganismos en procesos fermentativos favorece la degradación del sustrato e incrementa la disponibilidad de nutrientes contenidos en el alimento (Valiño *et al.* 2004, 2015a,b). En el caso de *A. oryzae* se demostró su efecto en la estimulación de la fermentación ruminal de sustratos fibrosos (Sosa *et al.* 2010b). Con su inclusión incrementaron las poblaciones de bacterias totales, celulolíticas y hongos del rumen y consecuentemente las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (Sosa *et al.* 2010a).

Por último, la subcolección de bacterias ácido lácticas (tabla 3) la integran cepas aisladas del tracto gastrointestinal de pollos de ceba alimentados con dieta basada en soya y maíz (García-Hernández *et al.* 2012). Todos los aislados se identificaron por pruebas bioquímicas y secuenciación del gen 16S ARN ribosomal (García-Hernández *et al.* 2016).

Table 3. Strains of acid lactic bacteria from ICA collection

Strain	Molecular identification	Access No. to the GenBank
LB-12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FR717460
LB-25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FR717465
LB-13	<i>Weisella cibaria</i>	FR717461
LB-31	<i>Lactobacillus pentosus</i>	FR717464

poultry and pigs during their growth stage has beneficial effects on morphological and physiological indicators, improves intestinal health, increases productive indicators and, in the case of birds, increases meat yield (Ayala *et al.* 2014 and García-Hernández *et al.* 2016).

For each sub-collection, curators were designated, according to more experienced staff and knowledge, not only about microorganisms and basic taxonomy, but also their growth and preservation conditions, their properties and potential applications.

Sequences of all microorganisms that constitute the collection are located in the GenBank from the World Data Center for Microorganisms (WDCM 2015). The collection was registered in the FELACC and in the WDCM. Curators and staff related to research are members of the Sección de Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos. ICA is an institutional member of FELACC and in the WFCC. This facilitates the exchange with other institutions and training in subjects related to the work in the collection.

Microorganism preservation. Preservation of microorganisms at a long term by freezing is widely used in different microbial strains and guarantees genetic stability of microorganisms. However, success of this method depends on factors like type of materials and the selection of the cryoprotectant (Singh and Baghela 2017).

a) Conservation of lactic acid bacteria by freezing with LEL–glycerol as cryoprotectant

Bacteria were cultivated in Petri dishes with Agar De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (De Man *et al.* 1960) and incubated at 37°C for 24 hours. Then, they were passed to a MRS medium and incubated at 37 °C for 24 hours. This culture was moved to Falcon tubes of 50 mL and centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes in a Neofuge 15R centrifuge (Heal Force, China). The supernatant was decanted and the sediment was re-suspended in 16 mL of a solution of yeast extract milk (LEL) and glycerol.

b) Conservation of filamentous fungi by freezing with glycerol at 10 %

Fungi were cultivated in an Erlenmeyer containing 30 mL de Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 30 °C for seven days. An amount of 60 mL of a solution of distilled water and glycerol at 10 % was added to each Erlenmeyer. A dragging of the sporulated surface was conducted and the spore suspension was filtered by glass wool.

c) Conservation of yeasts by freezing with glycerol

La inclusión de estos microorganismos a la dieta de pollos y cerdos en etapa de crecimiento ejerce efectos beneficiosos en indicadores morfo-fisiológicos, mejora la salud intestinal, incrementa indicadores productivos y en el caso de las aves, aumenta el rendimiento cárnico (Ayala *et al.* 2014 y García-Hernández *et al.* 2016).

Para cada subcolección se designaron los curadores, teniendo en cuenta al personal con mayor experiencia y conocimientos no sólo de los propios microorganismos y la taxonomía básica, sino también de sus condiciones de crecimiento y preservación, sus propiedades y potenciales aplicaciones.

Las secuencias de todos los microorganismos que conforman la colección se encuentran depositadas en el GenBank del Centro Mundial de Datos de Microorganismos (WDCM, por sus siglas en inglés) (WDCM 2015). La colección se registró en la FELACC y en el WDCM. Los curadores y personal vinculado a los trabajos de investigación son miembros de la Sección de Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos. El ICA posee la membresía institucional en la FELACC y en la WFCC. Lo anterior facilita el intercambio con otras instituciones y la superación en temas relacionados con el trabajo de la colección.

Conservación de microorganismos. La conservación de microorganismos a largo plazo por congelación, se utiliza ampliamente en diferentes especies microbianas y garantiza la estabilidad genética de los microorganismos. Sin embargo, el éxito de este método depende de factores como el tipo de materiales y la elección del crioprotector (Singh y Baghela 2017).

a) Conservación de bacterias ácido lácticas por congelación con LEL–glicerol como crioprotector

Las bacterias se sembraron en placas Petri con Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (De Man *et al.* 1960) y se incubaron a 37 °C por 24 horas, se pasaron a caldo MRS y se incubaron a 37 °C por 24 horas. El cultivo se pasó a tubos Falcon de 50 mL de capacidad y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos en centrífuga Neofuge 15R (Heal Force, China), se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 16 mL de solución de leche extracto de levadura (LEL) y glicerol.

b) Conservación de hongos filamentosos por congelación con glicerol al 10 %

Los hongos se sembraron en erlenmeyer que contenían 30 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron a 30 °C durante siete días. Se adicionó a cada erlenmeyer 60 mL de solución de agua destilada y glicerol al 10 %. Se realizó arrastre de la superficie

at 20 %

Yeasts were cultivated in Petri dishes with extract agar of yeast-peptone-glucose (YPG) and were incubated at 30 °C for 24 hours. Then, they were passed to a YPG medium and were incubated at 30 °C for 24 hours. This culture was moved to Falcon tubes of 50 mL and centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. The supernatant was decanted and the sediment was resuspended in 40mL of a solution of fresh medium and glycerol at 20 %.

In every case, 1mL of the culture were distributed with cryoprotectant in eppendorff of 2 mL of capacity, gradually frozen and stored in a freezer (MDF-C8V1, Sanyo, Japan) at -80 °C. Samples were taken for determining the concentration of viable cells of preserved cultures.

Selected methods coincide with the used by other authors for these microbial groups. Conservation by freezing with yeast extract milk (LEL)-glycerol as cryoprotectant was used in strains of acid lactic bacteria for food industry (Zamora 2003). The method used for the conservation of filamentous fungi is widely used for preserving pathogenic fungi (Gutiérrez *et al.* 2009, 2017). In the case of yeasts, Gujjari *et al.* (2010), demonstrated the effectiveness of freezing and keeping genetic integrity of strains preserved by this method.

Document preparation. The collection has a PNO that states the functions, responsibilities and main objectives of the collection, according to current regulations and Quality system from ICA. This document shows steps to be followed for the reception of strains, preparation and conservation of primary and work banks, and the controls to be carried out to these banks. The official documentation of the collection was defined, which included registers of entry and exit of biological material, control of conserved strains and strain record. The latter includes data of isolation date, host/substrate, locality, province, country; culture medium in which it was isolated, date, place and method of identification and preservation method. The information regarding the origin and state of the strain guarantee reliability for its use in research and production, since in both cases, it is essential to verify identity, conservation, stability and protection of the microorganism (Boundy-Mills *et al.* 2016).

In another group of procedures, methodologies for conservation of different microbial groups and determinations of viability, purity and genetic stability of cultures were described. Research protocols were developed that allowed selecting the optimal preservation method for each strain, the conservation time and the maximum number of subcultures that guarantee stability of microorganisms.

As a fundamental part of the documentation, the catalog of the collection is available. The annual frequency of edition updating was defined. It presents

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 51, Number 3, 2017. esporulada y se filtró la suspensión de esporas por lana de vidrio.

c) Conservación de levaduras por congelación con glicerol al 20 %

Las levaduras se sembraron en placas Petri con Agar Extracto de Levadura-Peptona-Glucosa (YPG) y se incubaron a 30 °C por 24 horas, se pasaron a caldo YPG y se incubaron a 30 °C por 24 horas. El cultivo se pasó a tubos Falcon de 50 mL de capacidad y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 40 mL de solución de medio fresco y glicerol al 20 %.

En todos los casos se distribuyó 1 mL de cultivo con crioprotector en eppendorff de 2 mL de capacidad, se congelaron gradualmente y se almacenaron en congelador (MDF-C8V1, Sanyo, Japón) a -80 °C. Se tomaron muestras para determinación de la concentración de células viables de los cultivos conservados.

Los métodos seleccionados coinciden con los que utilizaron otros autores para estos grupos microbianos. La conservación por congelación con LEL-glicerol como crioprotector se utilizó en cepas de bacterias ácido lácticas para la industria alimenticia (Zamora 2003). El método que se utilizó para la conservación de hongos filamentosos, se emplea ampliamente en la preservación de hongos patógenos (Gutiérrez *et al.* 2009, 2017). En el caso de la levaduras, Gujjari *et al.* (2010) demostraron la efectividad de la congelación para mantener la integridad genética de las cepas que se conservan por este método.

Elaboración de la documentación. La colección dispone de un PNO en el que se declaran las funciones, responsabilidades y los objetivos fundamentales de la colección, en correspondencia con las regulaciones vigentes y el sistema de Calidad del ICA. En este documento se establecieron los pasos a seguir para la recepción de las cepas, preparación y conservación de los bancos primarios y de trabajo, y los controles a realizar a estos bancos. Se definió la documentación oficial de la colección que comprendió: Registros de entrada y salida del material biológico, control de cepas conservadas y registro cepa. Este último incluye los datos de fecha de aislamiento; hospedero/sustrato; localidad, provincia, país; medio de cultivo en el cual se aisló; fecha, lugar y método de identificación y el método de preservación. La información relativa al origen y el estado de la cepa garantizan la fiabilidad para su empleo en la investigación y la producción, pues en ambos casos es imprescindible la verificación de la identidad, conservación, estabilidad y protección del microorganismo (Boundy-Mills *et al.* 2016).

En otro grupo de procedimientos se describieron las metodologías para la conservación de los diferentes grupos microbianos y las determinaciones de viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos. Se desarrollaron protocolos de investigación que permitieron seleccionar el método óptimo de preservación para cada cepa, el tiempo de conservación y el número máximo de subcultivos que garantizan la estabilidad de los microorganismos.

on the cover the title that identifies it, the department, the institution and the current year. In the section “Home”, it provides details of the origin of the product, objective and other descriptive elements that guarantee reliability of the offer. The content of the catalog is grouped in a table to have a better visualization of the information. The parts that the catalog offers are the following:

1. Strain collection (description of each strain, conservation method, applications and curator)
2. Regulations
3. Scientific publications of reference
4. Available services
5. Order request model
6. Contact

Internet was selected for its publication and pdf format was used for supporting the information product. This way, the catalog was ready to be inserted on the website of the institution and in other strategically identified spaces for the market.

The catalog will allow the dissemination of the results of science for commercial purposes by encouraging the use of microorganisms with potential for animal feed in the local and industrial production of food and additives. It contributes to the activity of disclosure and negotiation of the institution with the offer of a product that promotes sales or exchange of strains, as well as technical advice and scientific-technical services related to isolation, identification and conservation of microbial cultures. It also facilitates direct communication with those responsible for the collections of strains, which provides a better scientific exchange.

It is concluded that the establishment of the collection of microorganisms of the Instituto de Ciencia Animal, with conservation methods suitable for each microbial group, guarantees the availability of strains for teaching, research and obtaining additives for animal feed.

Como parte fundamental de la documentación se cuenta con el catálogo de la colección. Se definió la frecuencia anual de actualización de la edición. Presenta en la portada el título que lo identifica, el departamento, la institución y el año en curso. En la sección “Inicio”, detalla el origen del producto, el objetivo y otros elementos descriptivos que avalan la confiabilidad de la oferta. El contenido del catálogo se agrupa en una tabla para visualizar mejor la oferta de información. Las partes que ofrece el catálogo son las siguientes:

1. Cepario (descripción de cada cepa, método de conservación, aplicaciones y curador)
2. Regulaciones
3. Artículos científicos de referencia
4. Servicios disponibles
5. Modelo de solicitud de pedido
6. Contacto

Se eligió el medio de comunicación Internet para su publicidad y el formato pdf para soportar el producto informativo. De esta manera el catálogo quedó preparado para insertar en la página web de la institución y en otros espacios identificados estratégicamente para el mercado.

El catálogo permitirá la difusión de los resultados de la ciencia con fines comercializables al fomentar el uso de microorganismos con potencialidades para la alimentación animal en la producción local e industrial de alimentos y aditivos. Aporta a la actividad de divulgación y negociación de la institución con la oferta de un producto que promueve la venta o intercambio de cepas, así como, asesorías y servicios científico-técnicos relacionados con el aislamiento, identificación y conservación de cultivos microbianos. Facilita la comunicación directa con los responsables de las colecciones de cepas, lo cual viabiliza el intercambio científico.

Se concluye que el establecimiento de la colección de microorganismos del Instituto de Ciencia Animal, con métodos de conservación adecuados para cada grupo microbiano, garantiza la disponibilidad de cepas para la docencia, investigación y la obtención de aditivos para la alimentación animal.

References

- Ayala, L., García, Y., Savón, L. L., Boucourt, R., Castro, M. & Herrera, M. 2014. “Evaluación de la actividad probiótica del *Lactobacillus pentosus* en indicadores de salud y productivos de cerditos destetados”. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 21(3): 130–133, ISSN: 1026-9053.
- Belmonte, A., Nogueras, M. G., Contigiani, M. B., Gandini, V. & Sutich, E. G. 2008. “Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*”. Bioquímica y Patología Clínica, 72(2): 15–18, ISSN: 1515-6761.
- Bond, C. 2007. “Cryopreservation of Yeast Cultures”. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, (ser. Methods in Molecular Biology™), Humana Press, pp. 109–117, ISBN: 978-1-58829-377-0, DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_7, Available: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-362-2_7>, [Consulted: November 27, 2017].
- Boundy-Mills, K. L., Glantschnig, E., Roberts, I. N., Yurkov, A., Casaregola, S., Daniel, H.-M., Groenewald, M. & Turchetti, B. 2016. “Yeast culture collections in the twenty-first century: new opportunities and challenges”. Yeast, 33(7): 243–260, ISSN: 1097-0061, DOI: 10.1002/yea.3171.
- CE (Consejo de Estado) 1999. “Decreto-Ley 190 de la Seguridad Biológica”. Gaceta Oficial de la República de Cuba, (007): 114–118, ISSN: 1682-7511.
- CITMA (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente) 2000. “Reglamento de seguridad biológica para las instalaciones en las que se manipulan agentes biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética”.

- Gaceta Oficial de la República de Cuba, (8): 113–116, ISSN: 1682-7511.
- CITMA (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente) 2004. “Reglamento para la contabilidad y el control de materiales biológicos, equipos y tecnología aplicada a estos”. Gaceta Oficial de la República de Cuba, (2): 309–324, ISSN: 1682-7511.
- De Man, J. C., Rogosa, M. & Sharpe, M. E. 1960. “A Medium for the Cultivation of Lactobacilli”. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1): 130–135, ISSN: 1365-2672, DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- Del Puerto, C. A., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocedo, M. D., Carnota, G. & Martínez, R. 2009. “Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay”. *Vaccimonitor*, 18(1): 20–24, ISSN: 1025-028X.
- Del Puerto-Sardiñas, C. A., Hernández-Fundora, M., Leyva-Rodríguez, A. L., Baños-Paiffer, N., Fernández-Esperón, I. M., Cruz-Ferrer, A. & Martínez-Rivera, R. 2016. “Sistema de Lotes de Siembra de cepas de *Neisseria meningitidis* cultivadas en medios de origen no animal”. *Vaccimonitor*, 25(1): 0–0, ISSN: 1025-028X.
- FELACC (Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos) 2015. Boletín FELACC. 18th ed., FELACC, 31 p., Available: <http://www.aam.org.ar/src/img_up/25112015.0.pdf>, [Consulted: November 27, 2017].
- Floccari, M. E. 2005. “FELACC: Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos Microbianos”. *Agrociencia*, 9(1–2): 417–420, ISSN: 2301-1548, DOI: 10.2477/vol9iss1-2pp417-420.
- Galindo, J., Elías, A., Muñoz, E., Marrero, Y., González, N. & Sosa, A. 2017. “Ruminal activators, general features and their advantages for feeding ruminants”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(1): 11–23, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., Marrero, Y., González, N., Sosa, A., Miranda, A. L., Aldana, A. I., Moreira, O., Bocourt, R., Delgado, D., Torres, V., Sarduy, L. & Noda, A. 2010. “Effect of preparations with the viable yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and LEVICA-25 on methanogens and *in vitro* ruminal methanogenesis”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 267–272, ISSN: 2079-3480.
- García, H. Y. & García, C. Y. 2015. “Additives for animal feeding: The Institute of Animal Science on its 50 years”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(2): 173–177, ISSN: 2079-3480.
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N. & Halaihel, N. 2016. “Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production”. *Research in Veterinary Science*, 108(Supplement C): 125–132, ISSN: 0034-5288, DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.08.009.
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Elías Iglesias, A., Pérez-Sánchez, T., Salabarría, R. B. & Halaihel, N. 2012. “Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic”. *Research in Veterinary Science*, 93(2): 798–802, ISSN: 0034-5288, DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.09.005.
- Gujjari, P., Muldrow, T. & Zhou, J. J. 2010. “Effect of Cryopreservation Protocols on the Phenotypic Stability of Yeast”. *Cryoletters*, 31(3): 261–267, ISSN: 0143-2044, 1742-0644.
- Gutiérrez, A. C., Tornesello-Galván, J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D’Alessandro, C. & López Lastra, C. C. 2017. “Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina”. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2): 183–188, ISSN: 0325-7541, DOI: 10.1016/j.ram.2016.09.007.
- Gutiérrez, Y. A. P., Bustamante, S. L. & Buitrago, G. 2009. “Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea sp.*)”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2): 8–18, ISSN: 1909-8758.
- Iglesias, E., Del Puerto, C. A., Martínez, R., González, M., Baños, N. & Simón, B. 2010. “Establecimiento del cepario central del polo”. In: VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos, Ciudad de La Habana, Cuba: Ediciones Finlay, Available: <<http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>>, [Consulted: October 7, 2015].
- Iglesias, E., Morales, M., Weng, Z., Cabrera, I., Barrera, L., Morales, R., del Puerto, C. A. & Betancourt, V. 2006. Reporte del Trabajo de la Sección de Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos 2002-2006. Ciudad de La Habana, Cuba: Ediciones Finlay, ISBN: 959-7076-15-2.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. & Robert, V. 2011. “Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts”. In: *The Yeasts - A Taxonomic Study*, 5th ed., London: Elsevier, pp. 87–110, ISBN: 978-0-444-52149-1, DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0, Available: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000070>>, [Consulted: November 27, 2017].
- López-Lastra, C. C., Hajek, A. E. & Humber, R. A. 2001. “Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthorean fungi”. *Canadian Journal of Botany*, 79(7): 861–864, ISSN: 0008-4026, DOI: 10.1139/b01-061.
- Marrero, R. Y., Galindo, B. J., Torres, C. V., Aldama, C. A. & Noda, A. A. 2012. “Efecto de la inclusión de cepas de levaduras diferentes a *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal de *Cynodon nlemfuensis*”. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10), ISSN: 1695-7504, Available: <<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=63624631007>>, [Consulted: November 28, 2017].
- Marrero, Y., Burrola-Barraza, M. E., Castillo, Y., Basso, L. C., Rosa, C. A., Ruiz, O. & González-Rodríguez, E. 2013. “Identification of Levica yeasts as a potential ruminal microbial additive”. *Czech Journal of Animal Science*, 58(10): 460–469, ISSN: 1212-1819.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Burrola-Barraza, M. E., Lobaina, T., Rosa, C. A., Ruiz, O., González-Rodríguez, E. & Basso, L. C. 2011. “Morphological, biochemical and molecular identification of the yeast Levica 25: A Potential Ruminal Microbial Additive”. *Global Veterinaria*, 7(1): 60–65, ISSN: 1992-6197.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Ruiz, O., Burrola, E. & Angulo, C. 2015. “Feeding of yeast (*Candida spp.*) improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates”. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3): 514–519, ISSN: 2095-3119, DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60830-3.

- Marrero, Y., Galindo, J., Alvarez, E., Torres, V., Aldama, A. I., Boucourt, R., Elías, A. & Delgado, D. C. 2005. "Methodology for the isolation and characterization of yeasts from the ruminal ecosystem". Cuban Journal of Agricultural Science, 39(1): 47–52, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Galindo, J., Elías, A., Moreira, O. & Cueto, M. 2006. "Effect of biological preparations with viable yeasts on the microbial population in rumen and fermentative indicators in cows fed fibrous diets". Cuban Journal of Agricultural Science, 40(3): 321–329, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Ruiz, O., Corrales, A., Jay, O., Galindo, J., Castillo, Y. & Madera, N. 2014. "In vitro gas production of fibrous substrates with the inclusion of yeast". Cuban Journal of Agricultural Science, 48(2): 119–123, ISSN: 2079-3480.
- Montes de Oca, N., Gonzáles, R. A., Riverón, Y., Nuñez, A., Villoch, A. & Rodríguez, N. 2008. "Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA". Revista de Salud Animal, 30(1): 17–24, ISSN: 0253-570X.
- Oficina Nacional de Normalización 2006. Requisitos Generales para la Competencia Técnica de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. no. NC ISO/IEC 17025, La Habana, Cuba, Available: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/asuntos_ambientales/legislacion/3.%20Resoluciones/ISO%2017025%20Sistema_de_Calidad%20Laboratorios.pdf>, [Consulted: November 27, 2017].
- Oficina Nacional de Normalización 2015. Sistemas de Gestión de la Calidad – Requisitos. no. NC ISO 9001, La Habana, Cuba, Available: <<http://www.nueva-iso-9001-2015.com>>, [Consulted: November 27, 2017].
- Saab, O. C. A. de, Castillo, M. C. de, Ruiz, H. A. P. & Nader, O. M. de 2001. "A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*". Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96(4): 583–586, ISSN: 0074-0276, DOI: 10.1590/S0074-02762001000400022.
- Simões, M. F., Dias, N., Santos, C. & Lima, N. 2016. "Establishment of a Quality Management System Based on ISO 9001 Standard in a Public Service Fungal Culture Collection". Microorganisms, 4(2): 21, ISSN: 2076-2607, DOI: 10.3390/microorganisms4020021.
- Singh, S. K. & Baghela, A. 2017. "Cryopreservation of Microorganisms". In: Modern Tools and Techniques to Understand Microbes, Suiza: Springer, Cham, pp. 321–333, ISBN: 978-3-319-49195-0, DOI: 10.1007/978-3-319-49197-4_21, Available: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-49197-4_21>, [Consulted: November 28, 2017].
- Smith, D. 2012. "Culture Collections". Advances in Applied Microbiology, 79: 73–118, ISSN: 00652164, DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
- Smith, D. 2014. "Culture Collections". In: Batt, C. A. & Tortorello, M. L. (eds.), Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Oxford: Academic Press, pp. 546–552, ISBN: 978-0-12-384733-1, DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00079-3, Available: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000793>>, [Consulted: November 28, 2017].
- Sosa, A., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O. & González, N. 2010a. "Effect of *Aspergillus oryzae* on rumen microbial populations and end products of the fermentation of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115". Cuban Journal of Agricultural Science, 44(4): 359–365, ISSN: 2079-3480.
- Sosa, A., Galindo, J., Bocourt, R., Rodríguez, R., Albelo, N. & Oramas, A. 2010b. "Effect of *Aspergillus oryzae* on the rumen fermentation of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115 through the *in vitro* gas technique". Cuban Journal of Agricultural Science, 44(2): 151–155, ISSN: 2079-3480.
- Valiño, E. C., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T. & Albelo, N. 2004. "Improvement of sugarcane bagasse composition by the strain *Trichoderma viride* M5-2 in a solid-state fermentation bioreactor". Cuban Journal of Agricultural Science, 38(2): 143–150, ISSN: 0864-0408.
- Valiño, E., Dustet, J. C., Pérez, H., Brandão, L. R., Rosa, A. C. & Scull, I. 2015a. "Transformation of *Stizolobium niveum* with cellulolytic fungi strains as functional food". Academia Journal of Microbiology Research, 4(4): 062–071, ISSN: 2315-7771, DOI: 10.15413/ajmr.2015.0106.
- Valiño, E., Savón, L., Elías, A., Rodríguez, M. & Albelo, N. 2015b. "Nutritive value improvement of seasonal legumes *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium niveum*, *Lablab purpureus*, through processing their grains with *Trichoderma viride* M5-2". Cuban Journal of Agricultural Science, 49(1): 81–89, ISSN: 2079-3480.
- WDCM (World Data Center for Microorganisms). 2015. The Culture Collection in this World. WDCM Statistics, Available: <<http://gcm.wfcc.info/1114>>, [Consulted: November 27, 2017].
- WFCC (World Federation of Culture Collection) 2010. World Federation of Culture Collection. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd ed., Japan: WFCC Executive Board, Available: <<http://www.wfcc.info/guidelines/>>, [Consulted: November 27, 2017].
- Wu, L., Sun, Q., Desmeth, P., Sugawara, H., Xu, Z., McCluskey, K., Smith, D., Alexander, V., Lima, N., Ohkuma, M., Robert, V., Zhou, Y., Li, J., Fan, G., Ingsriswang, S., Ozerskaya, S. & Ma, J. 2017. "World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide". Nucleic Acids Research, 45(D1): D611–D618, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkw903.
- Zamora, R. L. M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Ph.D. Thesis, Universitat de Girona, España, ISBN: 978-84-689-3756-4, Available: <<https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/4892>>, [Consulted: November 28, 2017].