

# Diferencia en la viabilidad y estabilidad genética de mutantes de *Escherichia coli* crioconservados mediante un mismo método

Angela Estela Sosa Espinosa, Yoanna Ariosa Morejón,\* Tanilo Rivero\*\* e Ivón Estévez.

Colección de Microorganismos de Interés Biotecnológico, \*\*Departamento de Bioindustria, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba. \*Instituto de Investigaciones del Arroz, Carretera a San Antonio de los Baños, km 16, Bauta, La Habana, Cuba.

Recibido: 20 de febrero de 1998. Aceptado: 14 de diciembre de 1998.

Palabras clave: crioconservación, mutantes de *E. coli*.  
Key words: criopreservation, *E. coli* mutans.

**RESUMEN.** La Unión de Colecciones de Microorganismos de Rusia (VKM) utiliza una técnica simple para la congelación de células microbianas sobre gel de sílice, la cual aplica desde el año 1991 para preservar bacterias, hongos y levaduras de diversas especies. El objetivo de este trabajo fue determinar si este método es aplicable a diferentes mutantes de *E. coli* que se utilizan comúnmente como hospederos en la expresión de proteínas recombinantes. Con este propósito, se estudió el comportamiento de dos indicadores: la viabilidad de los cultivos conservados y la estabilidad de los marcadores genéticos en 21 cepas de *E. coli* K12, después de la liofilización sobre gel de sílice a los 30, 60 y 90 d de almacenamiento a -70 °C. La estabilidad de las cepas en estudio fue diferente. Las cepas que contenían mutaciones *recA* o *recBC* fueron más susceptibles a los daños que produce esta forma de conservación. Un estudio de la cepa HB101 transformada con diferentes plasmidios sugiere que la viabilidad, pero no la estabilidad genética depende de la información que portan los plasmidios. La forma de conservación dependió de la cepa, sobre todo, si estaban transformadas con plasmidios. En este caso, el método no es aplicable sin un estudio previo de estabilidad en tiempo real; debido a que la susceptibilidad a la conservación varía en dependencia del plasmidio introducido, según evidenció el estudio en la cepa HB101 de uso común en los trabajos de clonación de muchos laboratorios.

**ABSTRACT.** The Microorganism Collection Union (VKM) from Russia uses a simple technique for the freezing of cells on silica gel. This method has been employed in VKM collection since 1991 for the conservation of bacteria, fungi and yeasts from different species. The aim of this work was to determine whether this method can be applied to different *E. coli* strains that are commonly used as hosts for plasmids or as expression strains in the molecular biology labs. For this purpose, the behaviour of indicators such as: the viability and the genetic stability of genetic markers from 21 *E. coli* strains after liofilization on silica gel at 30, 60 and 90 d of storage at -70 °C was studied. The stability of the strain in study was different. The authors found that the strains containing the *recA* or *recBC* mutation are more sensitive to the damages that produce this type of conservation. A study of the HB101 strain transformed with different plasmids suggests that the viability but not the genetic stability depends on the genetic information contained on the plasmids. It was concluded that the election of the conservation form depends on the strain. In the case of recombinant strains the method is not applicable without a previous study of stability in real time. The stability varies depending on the plasmid introduced as the results of the study with the HB101 strain suggest. It's a strain of common use in the works of cloning in many laboratories.

## INTRODUCCION

La Unión de Colecciones de microorganismos de Rusia (VKM) desarrolló un método general de conservación de microorganismos en gel de sílice. Según los autores, este método brinda un conjunto de ventajas sobre otros métodos de conservación, tales como: la cantidad de cultivos que sobreviven al almacenamiento a largo plazo; es simple; capaz de mantener viables las células congeladas; produce pocos bioriesgos y reduce el número de ámpulas a almacenar.<sup>1</sup> El método se utiliza satisfactoriamente para preservar bacterias, hongos, levaduras, actinomicetos y algunas cepas de *E. coli* que portan plasmidios.<sup>1</sup>

Las cepas de *E. coli* que portan plasmidios, episomas o transposones son más difíciles de conservar que cepas salvajes.<sup>2</sup> Varios autores plantean que el método de conservación en cuña de agar no es recomendable para cepas *F'*, *Hfr*, o con transposones tales como *Mu*, *Mud* (*lac*, *Amp'*) o *Tn5* o que porten plasmidios como el pBR322 y sus derivados.<sup>2,3</sup>

En general, se ha estudiado poco la influencia de los métodos de crioconservación sobre la estabilidad de las cepas de *E. coli* de colección, los estudios de la última década incluyen la liofilización y otros métodos de secado.<sup>4,6</sup> Asimismo, la forma de preservar cepas modificadas genéticamente mediante métodos de ADN recombinante, también ha sido poco estudiada.<sup>7,8</sup>

Debido a esto, es muy difícil predecir si un método de conservación puede ser utilizado para cualquier cepa de *E. coli*, aunque es común encontrar que se generaliza la utilización de un método basado en el estudio de unos pocos mutantes de una especie microbiana.

El objetivo de este trabajo fue determinar los factores que influyen en la viabilidad y la estabilidad genéti-

ca de 21 Cepas de *E. coli* que se utilizan comúnmente como hospederos de plasmidios o como cepas de expresión y probar si el método desarrollado por Sidyakina<sup>1</sup> era adaptable a las condiciones materiales del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo, de manera que se pudiera evaluar si resultaba útil para conservar una amplia variedad de mutantes de *E. coli*.

**MATERIALES Y METODOS**

**Microorganismos empleados**

Las cepas de *E. coli* que se utilizaron en este estudio de conservación provinieron de la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana y fueron:

CEPA	GENOTIPO
JM 101	[F <sup>+</sup> tra D36 proAB <sup>-</sup> lacI <sup>+</sup> lacZ ΔM15] Δ(pro-lac) supE mcrA thi λ
NM 522	[F <sup>+</sup> lac I <sup>+</sup> Δ(lac Z)M15 pro <sup>+</sup> ] hsdΔS (r <sub>k12</sub> , m <sub>k12</sub> ) Δ(pro-lac) supE λ
W3110	F mcrA mcrB IN (rrnD - rrn E)1 λ
XL-1 blue*	[F <sup>+</sup> proAB+ lacI <sup>+</sup> lacZ ΔM15 Tn10] supE <sub>44</sub> hsdR <sub>17</sub> recA <sub>1</sub> end gyrA <sub>36</sub> thi relA <sub>1</sub>
LE392	F supE <sub>44</sub> supF <sub>28</sub> lacY <sub>1</sub> galK <sub>2</sub> galT <sub>22</sub> metB <sub>1</sub> trpR <sub>35</sub> hsdR <sub>214</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrE λ
MC 1061	F <sup>+</sup> hsdR (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB araD <sub>139</sub> Δ(araABC-leu) <sub>767n</sub> ΔlacX <sub>74</sub> galU galK rpsL thi λ
MC 1066*	F <sup>+</sup> ΔlacX74 hsdR (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) galU galK kan <sup>+</sup> trpC <sub>220</sub> leuB <sub>6</sub> ura3
JA 221	F lacY leuB <sub>6</sub> trpE <sub>5</sub> hsdR (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) recA <sub>1</sub> λ
GM 21633	F ara <sub>14</sub> leuB <sub>6</sub> thi-1 fhuA <sub>11</sub> lacY <sub>1</sub> tsx-78 galK <sub>2</sub> galT <sub>22</sub> supE <sub>44</sub> hisG <sub>1</sub> rpsL <sub>136</sub> xyl-5 mtl-5 mtl-1 dam13::Tn9 dcm-6 mcrB1 hsdR <sub>2</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrA.
DH5α	F supE <sub>44</sub> hsdR <sub>17</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) recA <sub>1</sub> gyrA <sub>36</sub> endA1 thi-1 relA <sub>1</sub> deoR λ
PMC 128	F ara14 leu-6 his-4 recB <sub>21</sub> recC22 sbcB15 λ
TG1-u-88*	F <sup>+</sup> [traD <sub>36</sub> proAB+ lacI <sub>0</sub> lacZ ΔM15] supE hsdΔS (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) thi Δ(lac-proAB)
Y1088	F Δ(lacU <sub>169</sub> ) proC::Tn5 supE supF metB trpR hsdR (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB rpsL tonA <sub>21</sub> (pMC9 Tet Amp <sup>r</sup> ) λ
Y 1090	F Alon trpC <sub>22</sub> ::Tn10 supF lacU <sub>169</sub> araD <sub>139</sub> mcrA rpsL (pMC9 Tet Amp) λ
RR1	F supE <sub>44</sub> lacY <sub>1</sub> ara-14 galK <sub>2</sub> xyl-5 mtl-1 leuB <sub>6</sub> proA <sub>2</sub> hsdS20 (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB recA <sup>+</sup> rpsL <sub>20</sub> thi-1 λ
KC8*	hsdR <sub>17</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) hisB <sub>163</sub> leu <sub>163</sub> leuB <sub>6</sub> pyrF::Tn5 trp9830 Δ(lacZYA) strA galU galA
HB101/pCI857/pEcoRV	F supE <sub>44</sub> lacY <sub>1</sub> ara-14 galK <sub>2</sub> xyl-5 mtl-1 leuB <sub>6</sub> proA <sub>2</sub> hsdS <sub>20</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB recA <sub>13</sub> rpsL <sub>20</sub> thi-1 λ / pCI857 (Kan <sup>r</sup> ) pEcoRV (Amp <sup>r</sup> Clm <sup>r</sup> )
W3110/pCI857/ pCJ55	F mcrA mcrB IN(rrnD-rrnE) <sub>1</sub> λ / pCJ55 (Amp <sup>r</sup> ) pCI857 (Kan <sup>r</sup> )
DH5α/pTQ22	F supE <sub>44</sub> hsdR <sub>17</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) recA <sub>1</sub> gyrA <sub>36</sub> endA <sub>1</sub> thi-1 relA <sub>1</sub> deoR λ pTQ22 (Amp <sup>r</sup> )
HB101/pGB90	F supE <sub>44</sub> lacY <sub>1</sub> ara-14 galK <sub>2</sub> xyl-5 mtl-1 leuB <sub>6</sub> proA <sub>2</sub> hsdS <sub>20</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB recA <sub>13</sub> rpsL <sub>20</sub> thi-1 λ / pGB90 (Amp <sup>r</sup> )
HB101/pEcoRV/Eco312/pCI857	F supE <sub>44</sub> lacY <sub>1</sub> ara-14 galK <sub>2</sub> xyl-5 mtl-1 leuB <sub>6</sub> proA <sub>2</sub> hsdS <sub>20</sub> (r <sub>k12</sub> m <sub>k12</sub> ) mcrB recA <sub>13</sub> rpsL <sub>20</sub> thi-1 λ / pCI857 (Kan <sup>r</sup> ) pEco312 (Amp <sup>r</sup> ) pEcoR1 (Clm <sup>r</sup> )

**Medios de cultivo utilizados**

El medio de Luria Bertani (LB)<sup>9</sup> se utilizó en: los cultivos donde se determinó la curva de crecimiento de los mutantes, la conservación, el conteo de viables y los chequeos de resistencia a antibióticos. Los chequeos fenotípicos de las cepas se hicieron con medio salino M9,<sup>9</sup> MacConkey Agar<sup>10</sup> y el medio Tioglicolato.<sup>10</sup> Estos dos últimos medios se emplearon en las pruebas de esterilidad.

Para verificar la presencia de mutaciones en las vías metabólicas de las fuentes de carbono las diferentes cepas se cultivaron en medio sólido M9 con suplemento de glucosa, galactosa, manitol, arabinosa y xilosa al 2 %. Para los chequeos de resistencia a antibióticos se utilizaron disoluciones de

ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (20 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (12,5 µg/mL), estreptomycin (25 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL).<sup>10</sup>

Para verificar las auxotrofias de las diferentes cepas, las células se cultivaron en medio sólido M9 con suplemento de prolina, metionina, triptófano, tiamina y uracilo a una concentración de 20 µg/mL.<sup>10</sup>

La disolución criopreservante fue glicerol al 10 % (Riedel de Haën).<sup>10</sup>

**Verificación del fenotipo**

Las auxotrofias se verificaron por el crecimiento de las diferentes cepas en placas con medio M9 que se enriqueció o no con el aminoácido de auxotrofia a una concentra-

ción de 20 µg/mL.<sup>10</sup> Las mutaciones en las vías metabólicas de las fuentes de carbono se verificaron comparando la formación de colonias en placas con medio M9 al que se adicionó hidrolizado de caseína al 1 % y glucosa al 0,5 % y la no formación de colonias en medio M9 con suplemento de hidrolizado de caseína al 1 y 0,5 % del azúcar que no puede ser metabolizada. Los marcadores de resistencia se verificaron por comprobación de la habilidad de la cepa de crecer en placas con medio que contenía el antibiótico a la concentración indicada. En todos los casos, se inoculó una gota de la suspensión celular sobre la superficie de los medios sólidos diseñados para la verificación de cada cepa y las placas se incubaron por 16 h a 37 °C.<sup>9,10</sup>

**Curvas de crecimiento**

El tiempo al cual los mutantes alcanzan la fase exponencial se determinó por crecimiento de cada cepa en erlenmeyers que contenían 200 mL de medio LB a 250 r/min a 37 °C por 13 h. Durante el crecimiento, se tomaron muestras estériles cada 1 h y se les determinó la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm, así como el número de células viables mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) contenidas en 1 mL de una dilución de 10<sup>-7</sup> del cultivo en disolución salina (NaCl 0,9%), la cual se extendió sobre la superficie de placas con medio LB. Estas se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se realizaron cuatro réplicas por cepa.<sup>10</sup>

**Método de conservación de cepas bacterianas sobre gel de sílice<sup>1,8</sup>**

Una simple colonia de cada cepa se inoculó en erlenmeyers de 2 L con 500 mL de LB con antibiótico en los casos necesarios y se incubaron a 37 ó 28 °C con agitación de 250 r/min según los requerimientos de las cepas durante 7 h. Después de este tiempo, las células se colectaron por centrifugación a 4 000 r/min a 4 °C por 15 min; se lavaron con agua destilada estéril bajo las mismas condiciones de centrifugación por 5 min. La suspensión celular se obtuvo por adición de 50 mL de glicerol al 10 % al precipitado para lograr una concentración entre 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> UFC/mL.

Paralelamente, 0,1 g de gránulos de gel de sílice pulverizados se adicionaron a ampulas de cristal de 3 mL. Se esterilizaron a 121°C por 1 h y luego, se tinalizaron por 5 h a 100 °C. Bajo condiciones asépticas se aplicó 1 mL de las suspensiones celulares sobre el soporte. Seguidamente, las ampulas se mantuvieron a -70 °C durante 4 h. Después de este tiempo se liofilizaron en una liofilizadora Modelo Edwards a -20 °C bajo 5,8 mbar de presión reducida durante 14 h. Las ampulas se sellaron y se almacenaron a -70°C.

El chequeo de las cepas se realizó inmediatamente después de liofilizar a los 30, 60 y 90 d de almacenamiento. Para la verificación de la pureza y la estabilidad genéticas, las ampulas se rehidrataron con 1 mL de NaCl 0,7 %, después de homogeneizar, la suspensión se utilizó para realizar diluciones seriadas hasta 10<sup>-7</sup> y se sembró 1 mL en las placas de chequeo. Se realizaron cuatro réplicas por cepa.<sup>1</sup>

**RESULTADOS Y DISCUSION**

Se abordó el estudio de un método de conservación de cepas<sup>1</sup> para evaluar si es generalizable para preservar los mutantes de *E. coli* que se utilizan comúnmente como hospederos de proteínas recombinantes. Estas cepas presentan por lo general, mutaciones que facilitan la verificación de su estabilidad genética antes y después de ser conservadas.

El método combina la inmovilización sobre gel de sílice con la criopreservación a -70 °C. Para adecuarlo a las condiciones de laboratorio, se sustituyó el paso de secado a 4 °C en desecadora por la liofilización, teniendo en cuenta que la *E. coli* es un microorganismo que tolera esta forma de conservación.

Puede esperarse que distintos mutantes de un mismo microorganismo se comporten igual a la hora de ser conservados por un método específico, sin embargo, a los tres meses de almacenamiento de las 21 cepas estudiadas en este trabajo, sólo dos mantuvieron una alta viabilidad (Tabla 1).

Las cepas LE392 y HB101 que contienen los plasmidios pEcoRI/pCI857/pEco312 mantuvieron un 100 %

de viabilidad a los 90 d de conservación. La KC8 disminuyó su viabilidad en un 80 % después de los 90 d de almacenamiento. En el resto de las cepas la supervivencia fue muy baja (Tabla 1).

El método no dio los resultados que se esperaban en relación con su posible generalización en diferentes cepas de *E. coli* y se encontró que la viabilidad dependió fundamentalmente de la cepa utilizada.

Aunque no se estudió previamente el empleo de la liofilización sobre gel de sílice, esta parece ser la causa de la baja viabilidad en catorce de las veintiuna cepas analizadas (Tabla 1, columna 1).

Es posible que la utilización de cepas como: XL-1-blue, JA221, DH5a, PMC128, RR1, DH5a y HB101 las cuales presentan genes mutados que codifican para las proteínas RecA o RecBC que tienen un papel fundamental en la reparación de daño al ADN, sea la causa de los bajos porcentajes de viabilidad encontrados en la mayoría de los casos.

La congelación puede ocasionar daños en el ADN, los cuales consisten en simples o dobles roturas en la molécula siendo estas últimas letales para la célula. Estos daños pue-

**Tabla 1.** Comparación de la supervivencia de diferentes mutantes de *E. coli* conservados por el método reportado por Sidyakina.<sup>1</sup>

Cepa	Tiempo de conservación (d)			
	0	30	60	90
	Supervivencia (%)			
LE392	100	100	100	100
HB101(pEcoRI/pEco312/pCI857)	100	100	100	100
KC8	100	100	100	20
GM2163	100	2	2	0,1
MC1066	100	2	0,2	0,2
Y1088	100	3,3	3,3	3,3
XL-1-blue	100	0,000 2	0,000 2	0,000 2
RR1	40	40	40	10
MC1061	30	0,9	0,9	0,9
PMC128	30	20	20	0,05
Y1090	20	0,2	0,1	0,02
W3110	20	20	20	10
DH5a	20	20	20	0,02
DH5a(pTQ22)	20	0,006	0,000 8	0,000 8
NM522	10	10	10	0,5
JM101	5,7	2,8	2,8	0,85
W3110(pCJ55)	3,3	0,002	0,002	0,001
TG1-u-88	3,3	3,3	3,3	3,3
JA221	2	2	2	2
HB101(pGB90)	1	0,03	0,03	0,002
HB101(pEcoRV/pCI857)	0,9	0,4	0,4	0,3

den ser causados por las desviaciones de iones y agua durante la congelación y el secado.<sup>2,3</sup> Las alteraciones no letales son reparadas por la bacteria en un medio apropiado durante la rehidratación.

Los autores del método consideran que la conservación sobre gel de sílice tiene la ventaja de que no produce cambios genéticos en las células.<sup>1,8</sup> Esta afirmación la basan en sus experiencias en la conservación de las cepas de *E. coli* la C600 y HB101 transformadas con los plasmidios pBR325 y pKN001. Tras estudiar la estabilidad genética en todas las cepas comprobaron que la mayoría mantuvo el fenotipo. La conservación de los marcadores de resistencia a antibiótico se verificó en las diez cepas que portan estos genes en plasmidios, en transposones o por la presencia de la mutación del gen cromosomal *rpsL* (*Str'*). De las cepas que no portan plasmidios, sólo la KC8 experimentó pérdidas de los marcadores de resistencia. Sin embargo, la disminución del porcentaje de viables es una muestra de que modificaciones no detectables por este chequeo debieron haber ocurrido en el genoma de estas cepas.

Con excepción de la HB101 (pEcoRI/pEco312/pCI857), se observó que los mutantes con fenotipo *RecA* o *RecBC* disminuyeron más drásticamente la viabilidad y fueron menos estables.

Para comprobar el efecto de la presencia de plasmidios se comparó la estabilidad plasmídica con la supervivencia en tres cepas diferentes (Tabla 2) y se observó que la viabili-

dad no se afectó en la HB101/pEcoRI/pEco322/pCI587 y sí, en el resto de las cepas. Los resultados con la HB101 sugieren que incluso los recombinantes de una misma cepa, no se comportan igual en cuanto a su supervivencia, sin embargo, la estabilidad genética sí fue del 100 % en todas las cepas, lo cual coincide con lo reportado por los autores del método.

Este estudio sugiere que el método de conservación sobre gel de sílice modificado puede ser aplicado a un número reducido de cepas de *E. coli* tales como la LE392 y que un estudio de sólo tres meses puede dar un criterio confiable de la estabilidad en tiempo real de los bancos correspondientes. Aquí se utilizó un gran número de cepas que portan la mutación *recA* debido a que son preferidas para la propagación de plasmidios y vectores de clonaje. Sin embargo, las cepas que se utilizan para la expresión de proteínas recombinantes no tienen esta mutación y pudieran ser las únicas factibles de conservar por este método.

En el caso de cepas recombinantes, el método no es aplicable sin un estudio previo de estabilidad en tiempo real, debido a que la susceptibilidad a la conservación varía en dependencia del plasmidio introducido, según evidencia el estudio en HB101 realizado en este trabajo.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eugenio Hardy y al Prof. Jesús A. Núñez Romay por su colaboración en la revisión crítica del manuscrito.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Sidiyakina T.M. Low-temperature freezing of microorganisms on gel de sílice. In Maintenance of microorganisms. 2nd Edn., Academic Press, London, 65-70, 1991.
2. Kirsop B. & Snell J.J.S. (Ed.) Maintenance of microorganisms: A manual of laboratory methods. Academic press, London, 23-25, 1984.
3. Hill L.R. and Kirsop B.E. Bacteria. Cambridge University Press, 82-93, 1991.
4. Fry R.M. and Greaves R.I.M. The survival of bacteria during and after drying. *J. Hyg.*, 49, 220, 1951.
5. Ryznar L. and Drasil V. Influence of repeated lyophilization on the survival of *Deinococcus proteolyticus*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.*, 36, 71, 1991.
6. Yoh M., Narita I., Miwatani T. and Honda T. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 10, 2326, 1991.
7. Israeli E., Shaffer B.T. and Hoyt J.A. Survival differences among freeze-dried genetically engineered and wild-type bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2, 594, 1993.
8. Sidiyakina T.M. and Golimbet V.E. Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with the recombinant plasmid during preservation by various methods. *Cryobiology*, 3, 251, 1991.
9. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed Cold Spring Harbor University Press. Cold Spring Harbor, 1989.
10. Miller G.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. 3th ed., 7-59, 1977.

**Tabla 2.** Comparación de la estabilidad plasmídica y la supervivencia, después de liofilizar y al cabo de los 90 d en varios recombinantes de una misma cepa de *E. coli*.

Cepa	Antibiótico	Después de liofilizar*		90 d*	
		Supervivencia	Estabilidad plasmídica	Supervivencia	Estabilidad plasmídica
(%)					
DH5a	-	20	-	20	-
DH5a (pTQ22)	Ampicilina	20	100	0,008 8	100
W3110	-	20	-	10	-
W3110 (pCJ55)	Ampicilina	3,3	100	0,001	100
HB101(pEcoRI/pEco312/pCI857)	Kanamicina	100	100	100	100
	Ampicilina		100		100
	Clorafenicol		100		100
HB101(pEcoRV/pCI857)	Kanamicina	0,9	100	0,3	100
	Clorafenicol		100		100
HB101(pGB90)	Ampicilina	1	100	0,002	100

\* Se ha tomado como el 100 %, el valor de la viabilidad inicial de los cultivos antes de ser conservados.