



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

T E S I S

**"CONSERVACION EN SOLUCION SALINA ESTERIL DE
HONGOS DE INTERES PARA LA ENSEÑANZA"**

Secretante:

CRISTINA FRAGOSO LOPEZ

Carrera:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO.

1. INTRODUCCION.
2. GENERALIDADES.
 - 2.1 Morfología
 - 2.2 Fisiología
 - 2.3 Clasificación
 - 2.4 Identificación de los hongos en estudio
 - 2.5 Técnicas de conservación de hongos.
3. MATERIALES Y METODOS.
 - 3.1 Determinación de las características de las cepas
 - 3.2 Conservación de las cepas en solución salina estéril
 - 3.3 Evaluación de la estabilidad de las cepas conservadas.
4. RESULTADOS.
 - 4.1 Verificación del género y especie de las cepas de hongos estudiadas antes y después del período de conservación - en el método seguido
 - 4.2 Conservación de las cepas en solución salina estéril
 - 4.3 Determinación de viabilidad y actividad bioquímica.
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.
6. BIBLIOGRAFIA.

1. INTRODUCCION.

Los hongos son uno de los grupos de seres vivos más ampliamente distribuidos en la naturaleza; se encuentran en una gran variedad de habitats: suelo, agua, aire, materia orgánica en descomposición, como parásitos de plantas, animales y hombre, etc. Actualmente se conocen alrededor de 50 000 especies clasificadas.

Por ello es de gran importancia el empleo de cultivos de hongos en buenas condiciones para el estudio o investigación de diversas enfermedades micóticas que afectan al hombre, animales y plantas para poder efectuar su diagnóstico y administrar un tratamiento adecuado. Así mismo, son importantes en estudios comparativos y taxonómicos de nuevos aislamientos efectuados a partir de suelos, plantas, productos alimenticios fermentados o en descomposición, etc. También es indispensable el uso de cepas de hongos en estado activo o viable para la producción de compuestos industrialmente importantes como son antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, para la transformación de esteroides, preparación de alimentos fermentados, etc.

Para propósitos de enseñanza en la Facultad de Química, en las materias de Microbiología General, Micología y Microbiología Farmacéutica, se requieren de cultivos de hongos viables y estables para que el alumno se familiarice con las diferentes propiedades que éstos presentan, y de esta manera pueda reconocer las características morfológicas indispensables para su identificación, así como sus características fisiológicas y actividad bioquímica. En

la realización de prácticas en Microbiología Industrial, Síntesis Microbiana de Aplicación Industrial, Toxicología, Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, Fermentaciones Industriales y Enzimología se requieren cepas de hongos viables para la obtención de antibióticos, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos, micotoxinas, preparación de alimentos, etc.

Para satisfacer la necesidad de cultivos fúngicos, adecuados para la enseñanza en la Facultad de Química, y como referencia para nuevos aislamientos, es esencial conservar cepas auténticas de hongos mediante técnicas de preservación que aseguren la viabilidad, pureza, patogenicidad y, en general, la estabilidad morfológica, fisiológica y bioquímica de los hongos.

Existen diversas técnicas para preservar cultivos de hongos, entre ellas se encuentran las siguientes: liofilización, congelamiento intenso, congelamiento a temperaturas ultra bajas (en nitrógeno líquido), transferencia periódica, dispersión de esporas en suelo estéril, inundación del cultivo con aceite mineral estéril y almacenamiento en agua destilada estéril.

De éstas técnicas, la transferencia o subcultivo periódico es la que se emplea actualmente en la Facultad de Química, pero no es una técnica apropiada pues resulta tediosa por el consumo de tiempo que se requiere para su ejecución, costosa por el uso constante de medios de cultivo y puede producir el deterioro o variación de las cepas por la transferencia continua y el mantenimiento de

los cultivos en estado activo.

Con excepción de las tres últimas técnicas mencionadas, las de más requieren de equipo costoso y de personal adiestrado en su manejo, que dedique a su ejecución bastante tiempo.

De acuerdo a las investigaciones bibliográficas efectuadas y a la disponibilidad de material con que cuenta la Facultad, una técnica de preservación adecuada para mantener cultivos de hongos a largo plazo, en un estado latente sin que pierdan ninguna de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas podría ser la conservación en agua destilada estéril.

Este trabajo consiste en montar y aplicar esta técnica de conservación para algunos de los hongos existentes en la Colección de Cepas de la Facultad de Química y en evaluar los resultados que se obtengan de la conservación, así como, la utilidad que presente esta técnica para el Cecario.

2. GENERALIDADES.

Para conservar cultivos de hongos es necesario contar con cepas puras que estén perfectamente clasificadas, es decir, que mediante sus características morfológicas se identifiquen género, familia, orden y clase a la que el hongo pertenece, y de ser posible, su especie. Es necesario conocer sus propiedades fisiológicas para determinar las condiciones de cultivo apropiadas y obtener resultados óptimos de crecimiento fúngico, que también nos ayudan a la clasificación de los hongos.

2.1 MORFOLOGIA.

A continuación se describen las características morfológicas en las que se basa la identificación de los hongos.

Estos microorganismos están constituidos por estructuras filamentosas de forma tubular llamadas HIFAS y a su conjunto se le denomina MICELIO. Hay dos clases de micelio, según su función: el micelio que penetra al sustrato y absorbe los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo se llama MICELIO VEGETATIVO o SOMÁTICO; y el que se proyecta por encima de la superficie del sustrato se conoce como MICELIO AEREO o REPRODUCTOR, y se encarga de la formación de las esporas que actúan como estructuras de propagación o reproducción. El grupo de hifas especializadas que sostienen a las esporas se llaman ESPOROFOROS.

El micelio puede ser: SEPTADO o CENOCITICO.

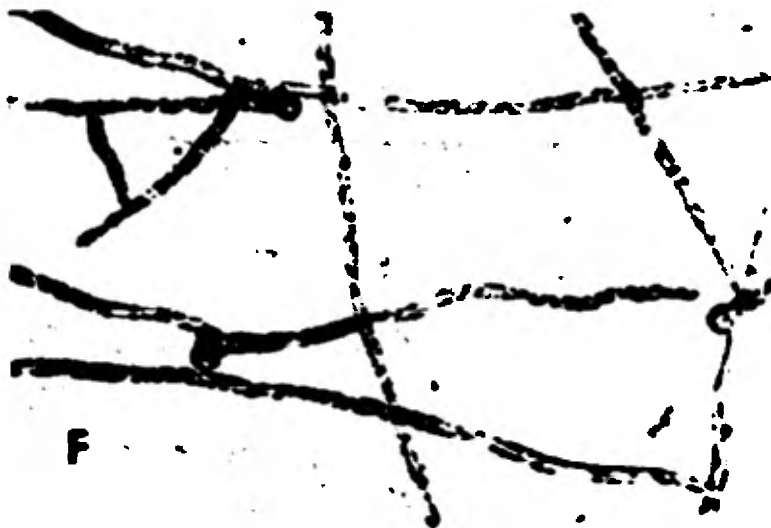
El micelio septado o tabicado (fig. 2.1,A) se caracteriza por presentar paredes transversales que dividen a la hifa a intervalos regulares; estos tabiques presentan un poro central que permite la circulación de las corrientes citoplasmáticas a lo largo de la hifa.

El micelio cenocítico o aseptado (fig. 2.1,B) no presenta tabicaciones y permite que el citoplasma fluya libremente a través de la hifa.

De acuerdo con su diámetro el micelio puede ser MACROSIFONADO (fig. 2.1,A,B) cuando mide más de una micra (por lo general de 5-6 micras) o MICROSIFONADO cuando mide menos de una micra (fig. 2.1,C).

FIG. 2.1 TIPOS DE MICELIO.

FIG. 2.1 TIPOS DE MICELIO.



B. Micelio cenocítico, macrosifonado.

Las estructuras de reproducción son las esporas, que pueden ser **SÉXUALES** o **ASEXUALES** y que se forman solo cuando el micelio vegetativo ha alcanzado cierto tamaño y grado de desarrollo.

Existen cuatro tipos de esporas sexuales que resultan de fenómenos de fecundación:

- Oosporas
- Zigosporas
- Ascosporas
- Basidiosporas.

Las esporas asexuales que son las más frecuentes, no dependen para su formación de fenómenos sexuales, sino que son el resultado de la transformación del micelio. Se conocen tres tipos de esporas asexuales:

- Talosporas
- Asperangiosporas
- Conidiosporas.

Las talosporas se derivan directamente del micelio y comprenden los siguientes tipos:

- Blastosporas
- Artrosporas
- Clamidiasporas
- Dictiosporas (ref. 21).

Las blastosporas se forman por gemación a partir de una célula reproductora. Estas esporas producen un

pseudomicelio por la formación de brotes o yemas alargadas que no se desprenden de las células progenitoras (fig. 2.2, A).

Las artrosporas se producen por la fragmentación del micelio, tienen forma rectangular y pared gruesa (fig. 2.2, B).

Las clausosporas se forman por engrosamiento y condensación de la hifa. Cuando se forman en el trayecto de la hifa se les llama CLAUDOSPORAS INTERCALARES; si se forman en el extremo de la hifa se denominan CLAUDOSPORAS TERMINALES; y cuando se originan a los lados de la hifa se conocen como CLAUDOSPORAS LATERALES (fig. 2.2, C). Son esporas inactivas de pared gruesa que producen la mayoría de los hongos cuando las condiciones ambientales son desfavorables.

Las dictiosporas son esporas multicelulares que pueden contener más de 50 células y se desarrollan en forma laminar. Cuando las células en lugar de aplasmarse forman una masa más o menos globular, con tabiques transversales y longitudinales se llaman MURIFORMES (Alternaria).

A. *Hlastosporas y pseudomicelio.*



B. *Artrosporas.*

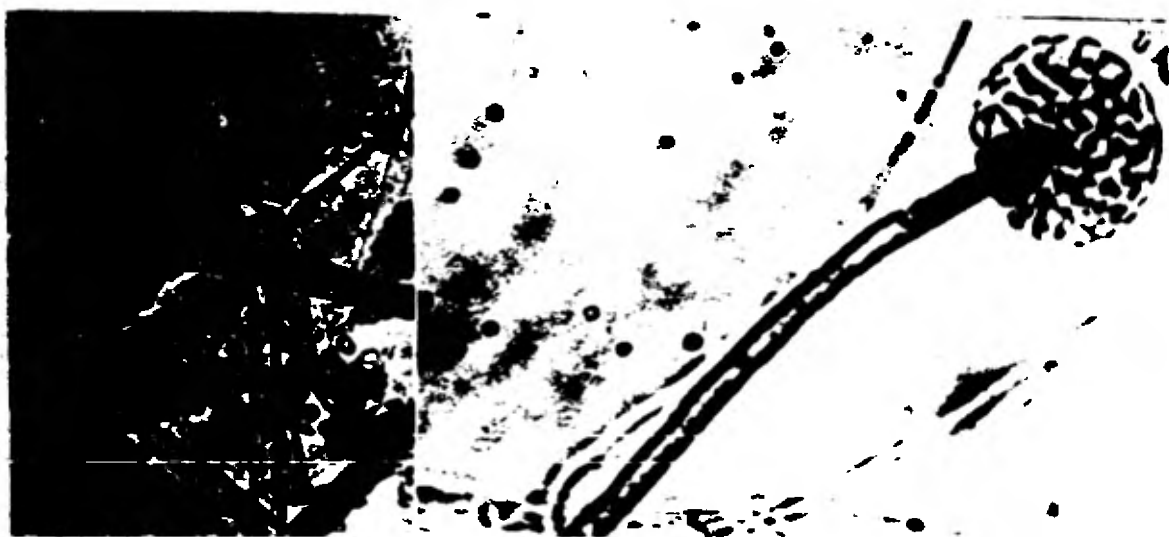
C. *Clamidospora intercalar.*



C. *Clamidosporas terminal y lateral.*

Las esporangiosporas son esporas endógenas que se forman dentro de estructuras especializadas llamadas ESPORANGIOS. La hifa a partir de la cual se desarrolla el esporangio se conoce como ESPORANGIOFORO. Estas esporas quedan en libertad al romperse la pared esporangial (fig. 2.3).

FIG. 2.3 ESPORAS ASEXUALES.



Esporangio, esporangióforo y esporangiosporas.

Las conidiosporas o conidias se forman sobre una hifa especializada llamada CONIDIÓFORO, y que se liberan o desprenden de la misma tan pronto como se desarrollan. El conidióforo sostiene directamente a las esporas o por medio de estructuras llamadas ESTERIGMAS. Las conidias unicelulares y pequeñas se llaman MICROCONIDIAS, y pueden ser esféricas, elípticas o en forma de pera (fig. 2.4,A). Las conidias grandes y multicelulares se les denomina MACROCONIDIAS, pueden dividirse en dos o más células por tabiques transversales y adoptar forma de huso o de maza; o pueden presentar tabiques transversales y longitudinales (suriformes), (fig. 2.4,B). Autores como Ulloa (ref. 16) y Conant (ref. 17) consideran que estas esporas suriformes son conidias, pero se prefiere la clasificación dada por Oscar Velasco (ref. 21) que las coloca dentro del grupo de las talosporas (diotiozporas).

FIG. 2.4 ESPORAS ASECUALES.



A. Conidióferos,
esterigmas y mi-
croconidias esfé-
ricas.

FIG. 2.4 ESPORAS ASEKUALES.

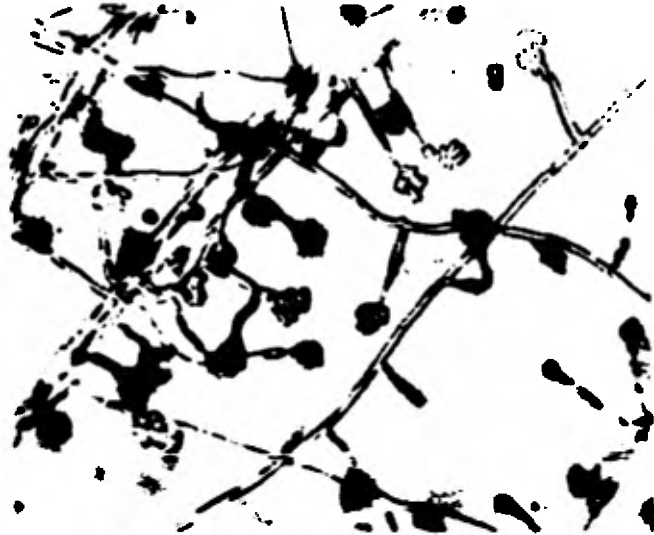


A. Conidióforo, esterignas y conidias esféricas.



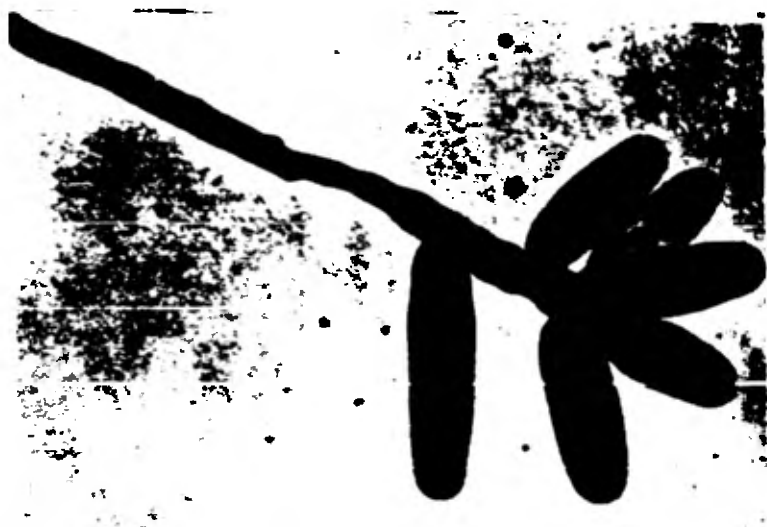
A. Conidióforos, esterignas y conidias elípticas.

FIG. 2.4 ESPORAS ASEKUALES.



A. Conidióforos y conidias elípticas.

FIG. 2.4 ESPORAS ASEKUALES.



B. Macroconidias elípticas.



B. Macroconidias en forma de huso.

FIG. 2.4 ESPORAS ASEXUALES.



B. Macroconidias en forma de masa.



B. Macroconidias suriformes (diotiosporas).

2.2 FISILOGIA.

Todos los hongos son heterótrofos y se nutren por absorción. Son microorganismos que crecen lentamente: requieren de una o dos semanas y en ocasiones hasta un mes de incubación para producir un buen desarrollo. Son cosmopolitas, se encuentran en toda clase de habitats, como saurófitos, en simbiosis o como parásitos.

Para su crecimiento, los hongos deben encontrar en el medio de cultivo los nutrientes necesarios: una fuente de nitrógeno, como la peptona; una fuente de carbono, como la glucosa o maltosa, en una concentración de 2 a 4%. Los hongos crecen en medios con gran cantidad de azúcar, ya que son capaces de resistir presiones osmóticas elevadas. Toleran y crecen en condiciones extremas de pH (2-9), siendo el pH óptimo para su crecimiento de 5,6. Algunos hongos requieren de vitaminas para favorecer su desarrollo.

Aunque necesitan de humedad para su crecimiento y pueden obtener el agua de la atmósfera, así como del medio de cultivo, pueden sobrevivir en ambientes desfavorables mediante la formación de esporas resistentes. Son aerobios estrictos y la temperatura óptima de crecimiento es de 27-28°C.

2.3 CLASIFICACION.

Existen divergencias en lo que concierne a la clasificación de los hongos. Su ubicación en el Reino Vegetal, en la división Thallophyta, ha dado lugar a múltiples polémicas puesto que no

ueden considerarse vegetales, ya que carecen del pigmento clorofila, y por tanto no son fotosintéticos: además algunos hongos tienen esporas móviles (zoosporas) por lo que podrían confundirse con protozoarios.

Debido a esto, Haeckel sugirió la creación de un tercer Reino, el Protista, que incluye a los organismos más simples, unicelulares, microscópicos y de vida autónoma, ubicando a los hongos dentro de los Protistas Superiores o Eucariotes, que son aquellos organismos que poseen un núcleo verdadero. Recientemente Whittaker (1969) creó un nuevo esquema de clasificación que comprende un nuevo Reino: Fungi. Basa su clasificación de miembros del Reino Fungi en la presencia o ausencia de micelio, tipo del mismo, características de las esporas (tamaño, forma, color) y forma de reproducción. A continuación se muestra el esquema de esta clasificación.

REINO FUNGI.

DIVISION EUMYCOTA.

Subdivisión: Phycomycotina

Clase: Chytridiomycetes

Clase: Hyphochytridiomycetes

Clase: Oomycetes

Clase: Zygomycetes

Orden: Eumerales

Familia: Mucoraceae

Género: Rhizopus

Clase: Trichomycetes

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Géneros: Aspergillus

Geotrichum

Paecilomyces

Penicillium

Familia: Dematiaceae

Géneros: Alternaria

Helvethesporium

Clase: Coelomycetes

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Hemiascomycetes

Clase: Saccomycetes

Clase: Laboulbeniomyces

Clase: Lecaniascomycetes

Subdivisión: Basidiomycotina

Clase: Heterobasidiomycetes

Clase: Holobasidiomycetes

DIVISION PHYLLOPHORA.

Clase: Acrasiomycetes

Clase: Myxomycetes

Clase: Plasmodiophoromycetes

La división MYXOMYCOTA incluye a los hongos mucilaginosos celulares, mucilaginosos plasmodiales y mucilaginosos plasmodiales endoparásitos, organismos que no son considerados como verdaderos hongos porque carecen de micelio, además de que se nutren principalmente por ingestión, un tipo de nutrición que no tienen los verdaderos hongos (Eumycota), los cuales se nutren por absorción.

Las subdivisiones de EUMYCOTA se diferencian principalmente por su forma de reproducción sexual.

PHYCOMYCOTINA.

Está constituida principalmente por hongos acuáticos; comprenden también hongos saurófitos y parásitos de plantas y animales, incluyendo al hombre. Estos hongos están formados por micelio grueso y cenocítico, aunque algunos lo tienen septado. La reproducción sexual es por medio de zigosporas y oosporas. La reproducción asexual es mediante zoosporas (esporas móviles), esporangiosporas (esporas inmóviles), esporangiolos, o raramente por conidias.

DEUTEROMYCOTINA.

Los deuteromicetos se encuentran comúnmente como saurófitos,

vero comprenden a la mayoría de los hongos patógenos para el hombre y animales. Se desconoce su estado perfecto o sexual, aunque a algunos hongos ya se les conoce su estado perfecto, y se reproducen asexualmente mediante conidias y talosporas. En la práctica se colocan aquí solamente los estados imperfectos o asexuales de los Ascomycetes y Basidiomycetes. Estos hongos tienen un micelio septado, con conidióforos característicos, aunque algunos son unicelulares.

ASCOMYCOTINA.

Constituye el grupo más grande de hongos. Muchos son de importancia económica como alimento y en procesos industriales, y como agentes causales de enfermedades en plantas y animales. Se reproducen sexualmente por medio de ascosporas que se forman dentro de una célula especializada: el asca. La mayoría de los ascomicetos producen un micelio septado, aunque unos cuantos son unicelulares. Su reproducción asexual es mediante talosporas y conidias.

BASIDIOMYCOTINA.

Constituye la clase de hongos más evolucionados. Los basidiomicetos son de amplia distribución, e incluyen a las comunes setas y a hongos económicamente importantes como las royas y carbones. Su reproducción sexual es por medio de basidiosporas que se forman externamente sobre una célula especializada: el basidio. Presentan micelio septado.

2.4 IDENTIFICACION DE LOS HONGOS EN ESTUDIO.

A continuación se describen las características morfológicas de los hongos sometidos a almacenamiento en solución salina estéril, para evaluar esta técnica de conservación a largo plazo.

Se eligieron aquellos hongos que tienen más utilidad para los propósitos de enseñanza en la Facultad de Química.

Las características macroscópicas que deben apreciarse para la identificación de los hongos son las siguientes: forma, tamaño, textura y aspecto superficial y del reverso de la colonia, color y si éste se difunde al medio o no, así como su velocidad de crecimiento. Las características microscópicas observadas son: tamaño del micelio y modalidades del mismo; tipo, tamaño y forma de las estructuras de reproducción.

Los hongos de esta subcolección son los siguientes:

DIVISION EUMYCOTA.

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Géneros: 1. Aspergillus

2. Penicillium

3. Geotrichum

4. Spicilomyces

Familia: Dermatiaceae

Géneros: 5. Alternaria

6. Helminthosporium

Subdivisión: Phycomycotina

Clase: Zygomycetes

Orden: Mucorales

Familia: Mucoraceae

Género: ? Rhizopus

A continuación se enumeran las especies de cada género que integran esta subcolección y se describen sus características morfológicas.

1. GÉNERO Aspergillus

1.1 Aspergillus flavus.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, abundante, ligeramente algodonoso. Al principio blanco, luego verde amarillento y finalmente verde pastoso, cubriéndose la superficie con abundante esporulación de aspecto granular (puntos gruesos) color verde pastoso. REVERSO: Incoloro o amarillento.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 8 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos largos, acortados, no ramificados que se dilatan en su extremo en grandes vesículas con esterigmas biseriadas que cubren la superficie de la vesícula. Las esterigmas sostie

nen cadenas de conidias unicelulares de forma esférica y de pared ligeramente rugosa.

1.2 Aspergillus fumigatus.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, abundante, superficie ligeramente plegada, filamentososa de aspecto aterciopelado a pulverulento. Al principio blanco, luego verde a verde grisáceo. REVERSO: Amarillento a café-amarillento oscuro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 8 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos largos aseptados, no ramificados que se ensanchan en su extremo en grandes vesículas con esterigmas uniseriadas que cubren parcialmente la superficie de la vesícula. Las esterigmas sostienen cadenas de conidias unicelulares, de forma esférica y de pared ligeramente rugosa.

1.3 Aspergillus ochraceus.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, abundante, superficie plegada ligeramente algodonosa. Al principio blanco, luego amarillo a café-amarillento, cubriéndose la superficie con abundante esporulación de aspecto granular (puntos gruesos) color café-amarillento. REVERSO: Café-amarillento oscuro o café-rojizo.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 8 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos largos aseptados, no ramificados que se dilatan en su extremo en vesículas que sostienen a su alrededor esterigmas uniseriadas que dan origen a cadenas de conidias unicelulares de aspecto globoso, ligeramente rugosas.

1.4 Aspergillus niger.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, abundante, micelio aéreo ligeramente algodonoso. Al principio blanco, luego negro-verduzco o a negro. La superficie se cubre con abundante esporulación de aspecto grueso color negro-verduzco a negro. **REVERSO:** Amarillento y en ocasiones ligeramente negro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 5 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos largos aseptados, no ramificados que se dilatan en su extremo en grandes vesículas con esterigmas biseriadas que cubren la superficie de la vesícula. Las esterigmas sostienen cadenas de conidias unicelulares de forma esférica y pared rugosa. El micelio, conidióforos y conidias tienen color negro.

Se cuenta con 4 variedades más de Aspergillus niger que son:

- 1.5 Aspergillus niger 2M-1
- 1.6 Aspergillus niger 2M-2
- 1.7 Aspergillus niger 2M-3
- 1.8 Aspergillus niger (ceca #5).

2. Género Penicillium

2.1 Penicillium notatum.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, superficie ligeramente plegada, aterciopelada a pulverulenta por la abundante esporulación. Al principio blanco, luego verde a verde ligeramente grisáceo. ReV-R30: Café-amarillento.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-23°C). 4 a 3 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos septados que se ramifican y adquieren aspecto de vincl, sostienen a esterigmas, en forma de frasco, que dan origen a cadenas de conidias unicelulares, de forma globosa y pared ligeramente rugosa.

2.2 Penicillium sp. productor de antibiótico (ceca -13), -- (ref. 18).

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, superficie ligeramente plegada,

aterciopelada a pulverulenta por la abundante esporulación. Al principio blanco, luego verde a verde aceituna; la parte central se cubre de color amarillo verdoso ligeramente rojizo. REVERSO: Amarillo-rojizo.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 8 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos septados, no ramificados que sostienen esterigmas biserialadas, en forma de frasco, que dan origen a cadenas de conidias unicelulares, de forma elíptica y pared lisa.

2.3 Penicillium sp. productor de antibiotico (cepa #16), -- (ref. 18).

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, superficie aterciopelada, ligeramente pulverulenta y plegada. Al principio blanco, luego verde-amarillento a verde claro con matices amarillentos en la parte central de la colonia. REVERSO: Café-amarillento.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 5 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado; conidióforos septados, ramificados en forma de vincl que sostienen este-

riguas en forma de frasco, las cuales dan origen a cadenas de conidias unicelulares, de forma esférica y ligeramente rugosas.

Además se cuenta con otras tres cepas de Penicillium que son las siguientes:

2.4 Penicillium sp.

2.5 Penicillium sp. aislado del suelo

2.6 Penicillium sp. aislado de lácteos en descomposición.

3. GÉNERO Geotrichum

3.1 Geotrichum sp.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, superficie plana, membranosa de consistencia levaduriforme; en ocasiones adquiere aspecto harinoso. Al principio blanco y finalmente color cremoso. REVERSO: Incoloro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-25°C). 4 a 5 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, sacosifondo, el cual se segmenta en artrosporas rectangulares redondeadas en sus extremos. En ocasiones pueden encontrarse tubos germinativos localizados en los extremos de las artrosporas.

4. GÉNERO Pezizomyces

4.1 Pezizomyces sp.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, se extiende en la superficie de

agar formando una capa delgada de aspecto aterciopelado. Al principio blanco, luego blanco-rosáceo. REVERSO: Incoloro o ligeramente café-amarillento.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 5 días.

Aspecto microscópico.

Sicelio septado, macrosifonado; conidióforos ramificados en forma de pinel, sostienen esterigmas que se alargan en su extremo, en forma de vabillo y a partir de ellas nacen las cadenas de conidias unicelulares, de forma elíptica y pared lisa. Aparecen esterigmas aisladas que se originan directamente de la hifa y que sostienen a las cadenas de conidias.

6. GÉNERO *Alternaria*

6.1 *Alternaria* sp.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, su sicelio crece cerca de la superficie de agar, ligeramente algodonoso, liso. Al principio blanco, luego gris verdoso y finalmente negro con los bordes gris obscuro. REVERSO: Negro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 10 días.

Aspecto microscópico.

Sicelio septado, macrosifonado, color gris obscuro; conidióforos septados danio origen a macroconidias co--

lor gris obscuro, que presentan tabicaciones transversales y longitudinales (muriformes), dispuestas en cadenas.

6. G2N280 Helminthosporium

6.1 Helminthosporium sp.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, superficie algodonosa lisa. Al principio blanco, luego gris y finalmente negro; el micelio se destruye en la parte central, quedando elevado en la periferia con un color gris obscuro. P2V2850: Negro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 10 días.

Aspecto microscópico.

Micelio septado, macrosifonado, color gris obscuro; conidióforos cortos, simples y en ocasiones ramificados, de aspecto nudoso (enrollados o encurvados en sus extremos). Las macroconidias son terminales y laterales, color gris obscuro, aparecen en racimos unidas libremente al conidióforo nudoso; tienen forma elíptica con varias tabicaciones transversales.

7. G2N280 Rhizopus

7.1 Rhizopus oligosporum.

Aspecto macroscópico.

Crecimiento rápido, abundante, cubriendo el tubo con

micelio aéreo algodonoso. Al principio blanco, luego -- gris obscuro, superficie cubierta con puntos de color - gris obscuro. REVERSO: Incoloro.

Temperatura y tiempo de incubación.

Temperatura ambiente (27-28°C). 4 a 8 días.

Aspecto microscópico.

Micelio cenocítico, macrosifonado; esporangióforos - largos, no ramificados se unen entre sí por medio de hifas diferenciadas llamadas estolones, en cuyo punto de - conexión se produce un racimo de rizoides (hifas en forma de raíz). Los esporangióforos terminan en un esporangio esférico, color negro que contiene esporangiosporas unicelulares, de forma esférica venos coloreadas. El extremo dilatado del esporangióforo, la columela se extiende hacia el interior del esporangio, tiene forma oval, - y es visible cuando se rompe la pared esporangial dejando en libertad a las esporangiosporas.

Se cuenta con otra cepa más de Rhizopus:

7.2 Rhizopus sp.

2.5 TÉCNICAS DE CONSERVACION DE HONGOS.

El uso de cultivos de hongos en la industria es muy amplio e incluye: la producción de antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas; la conversión de esteroides, la preparación de alimentos, etc. Son importantes también en la alteración de los alimentos y productos forestales; en el diagnóstico y tratamiento de las

micosis que afectan al hombre y a los animales; en los trabajos de investigación sobre patogenicidad y toxicidad, mediante inoculación en animales de laboratorio; para determinar su capacidad de infectividad en plantas. Por ello, en la enseñanza de la Microbiología, se requieren de cultivos auténticos de hongos - que se encuentren en buenas condiciones.

Es necesario evitar la contaminación de estos cultivos con bacterias, ácaros u otros hongos y se debe evitar que los cultivos se pleomorfinen y sufran cambios fisiológicos y bioquímicos.

Para la conservación de cultivos de hongos es necesario contar con métodos que aseguren la estabilidad morfológica y genética, así como la patogenicidad, pureza y viabilidad, aún después de períodos prolongados de almacenamiento.

En la introducción se han mencionado algunas de las diferentes técnicas para preservar cultivos de hongos; a continuación se describen brevemente las más utilizadas:

2.5.1. TRANSFERENCIA PERIODICA.

Este es el método clásico y más usado para mantener cultivos de hongos a largo plazo por transferencia a intervalos frecuentes, en estado activo, utilizando sustratos sólidos o líquidos. Las transferencias deben hacerse mensual o bimestralmente para evitar que el medio de cultivo se deshidrate y por ende las cepas mueran; la velocidad de deshidratación del medio depende del tipo de tapon utilizado, la humedad relativa y el tamaño del tubo.

Este método es efectivo solo para aquellos hongos que no sean propensos al pleomorfismo o a otra clase de degeneración, como la pérdida de propiedades fisiológicas y bioquímicas. Estos cambios degenerativos ocurren en la mayoría de los hongos a medida que se subcultivan periódicamente, debido a que se mantienen en un estado metabólico activo.

El peligro de que ocurran cambios en sus características aumenta si al hacer la transferencia, el inóculo se toma de las áreas de crecimiento más viejas donde la acumulación de productos del metabolismo puede ejercer una influencia autagénica. Para evitar estos cambios es necesario hacer los subcultivos a intervalos frecuentes, tomando el inóculo de las áreas jóvenes de crecimiento activo y alternando regularmente medios de cultivo ricos y pobres en nutrientes, para favorecer la esporulación y mantener las características originales de los cultivos.

Otro problema que presenta este método es la contaminación, como resultado del crecimiento de otros hongos en los tapones de algodón o la infestación con ácaros. Este último problema se evita cambiando los tapones por otros que estén impregnados con una solución de bicloruro de mercurio, safranina, alcohol etílico y glicerina; aunque esta mezcla puede tener también efectos dañinos para los hongos, ocasionando algunas veces su muerte.

El uso de tapones de baquelita en lugar de tapones de algodón, es poco conveniente porque la falta de intercambio gaseoso de los cultivos con el exterior mientras éstos tienen actividad metabólica, limita el consumo de oxígeno y favorece la acumulación de metabolitos gaseosos, lo cual puede tener efectos nocivos y alterar las características de los hongos, principalmente en su morfología.

El almacenamiento de los cultivos desarrollados, en refrigeración, a aproximadamente 5°C, evita la rápida desecación del medio y previene el crecimiento continuo de los hongos, alargando los periodos de transferencia. Se prefiere el almacenamiento a temperatura ambiente, ya que excluye la posibilidad de crecimiento anormal que podría ocurrir durante la refrigeración, aunque los subcultivos tienen que ser más frecuentes sobre todo en los lugares calurosos.

Este método tiene la ventaja de que siempre se tienen cultivos disponibles para demostración a estudiantes y visitantes, para estudios comparativos, etc., pero es el método que consume más tiempo de trabajo y es más costoso por el consumo de medios de cultivo. Otras limitaciones de este método son: la selección continua de sustratos apropiados, la habilidad técnica para transferir la masa de esporas y/o fragmentos de micelio, la necesidad

de vigilancia constante para evitar contaminación y la necesidad de proteger a los cultivos de la infestación con ácaros.

2.5.2. CONSERVACION CON ACEITE MINERAL.

Este método es una variante de la transferencia periódica, que consiste en prevenir la deshidratación del medio de cultivo y retardar la actividad metabólica y crecimiento de los hongos, reduciendo el consumo de oxígeno, con lo cual se alarga el período entre transferencias.

Consiste en cubrir con aceite mineral, de grado medicinal, los cultivos jóvenes de hongos con actividad metabólica, es decir, cultivos que se encuentren en buenas condiciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, desarrollados en un sustrato apropiado, en tubo inclinado. El aceite debe sobrepasar la superficie del cultivo, de tal manera que el micelio quede totalmente sumergido en él.

El consumo de oxígeno en los cultivos sumergidos en un tubo bajo el aceite mineral, se reduce a solo 10 % de lo normal en unas pocas horas. La reducción en la actividad metabólica es evidente por el retardo en el crecimiento y esporulación de los cultivos. La utilización de capas de aceite mineral que sobrepasen la superficie del micelio en más de un cm es desfavorable para la conservación de los hongos; aunque este efecto puede atribuirse al cese de actividad metabólica por falta de oxígeno, también hay evidencias de que el aceite resulta tóxico en

condiciones de total agotamiento del oxígeno. Para aplicar esta técnica es necesario observar las siguientes precauciones: a) el aceite mineral debe ser de grado medicinal, esterilizarse por dos horas a 121°C y secarse en el horno a 170°C por una o dos horas; b) el aceite debe cubrir el medio inclinado hasta aproximadamente un cm arriba de la superficie del cultivo; c) la temperatura de almacenamiento debe escogerse cuidadosamente, siendo preferible la temperatura ambiente, ya que la refrigeración puede ser nociva para ciertos hongos; d) la transferencia debe hacerse en el mismo medio en el que se preservó.

Esta técnica se ha usado principalmente para extender la longevidad de los hongos y se le ha dado poca importancia al mantenimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas. Los cultivos sobreviven largos tiempos, aproximadamente de 12 a 18 meses, e inclusive pueden conservarse sin perder viabilidad por varios años. Sin embargo, los cultivos de hongos cubiertos con aceite cuando se transfieren no presentan cambios pleomórficos, y las características fisiológicas y bioquímicas originales, después del almacenamiento tienen poca tendencia a variar. Se reduce la frecuencia de transferencia y se controla eficazmente la infestación producida por los ácaros. Se ha observado que los cultivos infestados, después de un período de tres meses en contacto con el aceite quedan libres de ácaros.

Es una técnica simple y barata, ya que los cultivos no requieren de ningún tratamiento preliminar ni se requieren aparatos especiales. Entre los hongos, tiene una amplia aplicación en la preservación de formas no esporulantes o estrictamente miceliales, en las cuales, su manejo dificulta la aplicación de otras técnicas.

Para hacer la transferencia se remueve una pequeña porción del cultivo de debajo de la superficie del aceite mineral y después de escurrir el exceso de aceite, se coloca en un tubo con el medio de cultivo usado originalmente. La transferencia no es fácil de realizar y menos con limpieza, además se corre el peligro de infección para el personal debido a la formación de aerosoles de aceite contaminado con esporas, al flamear el asa.

2.5.3. CONSERVACION DE CULTIVOS EN SUELO.

Existen dos variantes para la conservación de cultivos de hongos por este método:

- a) Inoculación de un volumen pequeño de suspensión de esporas en suelo seco estéril, seguida de secado.
- b) Inoculación de volúmenes mayores de suspensión de esporas, en suelo humedecido estéril, seguida de incubación.

La primera de estas técnicas no permite el crecimiento de los hongos y solo se preservan las esporas introducidas en el suelo. La segunda, al permitir

el crecimiento, preserva células de propagación y micelio, por lo menos de una generación, a partir del inóculo introducido.

La técnica más usada para preservar cultivos de hongos en suelo estéril consiste en inocular cinco gramos de suelo margoso estéril (20% de humedad) con un ml de una suspensión acuosa densa de esporas, seguida de secado a temperatura ambiente y almacenamiento en refrigeración. El suelo margoso puede reemplazarse por suelo bentonoso, arena de mar, arcilla, aserrín, carbonato de calcio o fosfato monocalcico, pero se ha observado que la margosa o arena son los medios de almacenamiento más satisfactorios.

Con este método se han conservado cultivos de hongos durante meses y, en ocasiones, años sin pérdida de sus propiedades originales como son el color, la forma, el tamaño de la colonia, la esporulación, el comportamiento enzimático, la virulencia. El almacenamiento de los hongos en suelo evita o reduce a un mínimo las alteraciones biológicas o morfológicas que se producen al mantener los cultivos por otros métodos de conservación, como la transferencia periódica, en donde las cepas originales son reemplazadas por formas mutantes.

Cuando un cultivo fúngico ha perdido ciertas características por el subcultivo prolongado, se pueden restaurar parcialmente dichas características si se

le mantiene en suelo estéril. entonces, además de resultar un medio de preservación a largo plazo, sirve para renovar cultivos degenerados, ya que promueve la esporulación en abundancia.

Las desventajas que presenta este método son que resulta imposible observar las características de crecimiento de los hongos y detectar alguna contaminación, sin hacer antes un nuevo cultivo para verificar la pureza de las cevas. Además en ocasiones falla, debido a que las esporas de algunos hongos pueden germinar pero son incapaces de crecer en condiciones de escasa humedad, por lo que el secado subsecuente puede matar a las esporas germinativas más delicadas.

Existe una variación del método de conservación en suelo estéril, y es la preservación de los cultivos en agar suelo. El agar suelo se prepara únicamente con suelo margoso, agar y agua destilada. Es esencial utilizar un suelo rico en humus pero no demasiado ácido; un pH de 6 a 6.5 es satisfactorio. Se debe tener especial atención en la esterilización de este medio; se requieren tres tratamientos en tres días sucesivos, cada uno durante 15 minutos a 120°C o solamente un día por una hora a la misma temperatura. Si el suelo es muy ácido, el agar tenderá a hidrolizarse.

El crecimiento de los hongos en este medio es muy pobre y es esencial enriquecerlos con la ayuda del ni-

croscopio; cuando sea satisfactorio, los tapones de los tubos deberán cubrirse con parafina para mantener un buen grado de humedad. Los tubos se guardan en refrigeración, aunque también pueden mantenerse a temperatura ambiente. Las cepas mantenidas en este medio, al ser nuevamente cultivadas en Sabouraud conservan sus características originales. En general se prefiere el método de conservación en suelo estéril, ya que presenta menos posibilidades de que ocurran cambios morfológicos y fisiológicos puesto que se han reportado casos de variación en algunas cepas mantenidas en agar suelo.

2.5.4. LIOFILIZACION.

La liofilización (congelamiento-secado) es otro de los métodos de preservación a largo plazo que evita el deterioro o variación de los hongos por la transferencia periódica. Este método, como los anteriores, inactiva a los cultivos y los mantiene en un estado latente, pero su inactivación es más eficaz.

La liofilización es el más laborioso de los métodos de conservación de cepas microbianas. Su empleo se justifica porque asegura plena estabilidad en las características de las cepas por mayor tiempo que cualquier otro método.

La laboriosidad de este método obedece a dos razones:

que implica varias operaciones y que se requiere de cuidados extremos en cada una de ellas. Las operaciones involucradas en el proceso de liofilización de un hongo son:

- 2.5.4.1) Preparación de los cultivos
- 2.5.4.2) Preparación de la suspensión de esporas
- 2.5.4.3) Envasado
- 2.5.4.4) Precongelamiento
- 2.5.4.5) Liofilización
- 2.5.4.6) Sellado de ampollitas
- 2.5.4.7) Revisión y selección de ampollitas.

2.5.4.1) Preparación de los cultivos.

Para preparar una suspensión de esporas adecuada para la liofilización, los hongos deben crecer en condiciones óptimas. Se someten al proceso de liofilización solo cuando están completamente maduros y poseen tantas esporas como sea posible.

Se cultivan en tubos inclinados conteniendo un medio de agar que favorezca la esporulación en abundancia; por tanto se prefieren aquellos medios pobres en nutrientes, ya que estimulan la esporulación. Uno de los medios recomendados es el agar de congelamiento que contiene papa, glucosa, extracto de levadura y carbón -

activado, con el cual se han obtenido buenos resultados (ref. 3). Algunos hongos esporulan mejor en medios líquidos y se deben cultivar en frascos conteniendo el medio apropiado.

2.5.4.2) Preparación de la suspensión de esporas.

Las esporas obtenidas en los medios de cultivo se cosechan en un soporte que las proteja de daños físicos durante el pre-congelamiento y la liofilización. Los soportes más utilizados son: la leche descremada estéril, y el que contiene sacarosa, peptona, suero de buey y agua destilada.

La suspensión se prepara por inundación y raspado con asa, de los cultivos en agar que han alcanzado un punto de esporulación óptimo y asegurando una concentración final de no menos de 10^6 esporas/ml.

Cuando la esporulación óptima se obtiene en medios de cultivo líquidos, se centrifugan y decantan; después se resuspenden las esporas en el soporte.

2.5.4.3) Envasado.

Una vez preparada la suspensión de esporas debe envasarse y pre-congelarse en un lapso bre

ve, para evitar la germinación.

Para el envasado, se transfieren 0.3 ml de la suspensión a cada uno de pequeños tubos estériles que contienen una etiqueta, de papel - bond y, escrito a lápiz, el nombre y/o número de la cepa y la fecha de liofilización; los tubos se tapan con torundas de algodón hidrófilo para que permita la desecación de la muestra a través de él y estas torundas se recortan después de envasar la suspensión, cuidando de no destapar los tubos, para facilitar la desecación.

2.5.4.4) Precongelamiento.

El precongelamiento puede hacerse por diferentes técnicas, dependiendo del aparato de liofilización que se utilice. Puede hacerse por inmersión de los tubos en nitrógeno líquido a -196°C ; este precongelamiento es muy rápido. También se puede usar un refrigerador que mantiene una temperatura de -65°C durante 1.5 h; o bien por inmersión de los tubos en una mezcla de hielo seco-alcohol. El precongelamiento debe ser lo más rápido y uniforme posible, para evitar la formación de agujas de hielo que dañan a las células.

2.5.4.5) Liofilización.

Una vez precongelaos los tubos (ampolletas) con la suspensión de esporas, se conectan a la liofilización, proceso en el cual el hielo será sublimado por el efecto del vacío y la baja temperatura, para secar la suspensión.

Para ello, se colocan de 18 a 20 ampolletas en cada frasco de centrifuga y éste se conecta en la liofilizadora mediante una junta herméctica. Durante las primeras 4 horas de secado, - denominadas de liofilización primaria, la temperatura sube gradualmente de -90°C (en el caso de precongelamiento con hielo seco-etanol) a 0°C ; el proceso debe continuarse aún por 2 o 3 horas más, hasta que los tubos alcancen una temperatura de alrededor de 30°C (liofilización final).

Debe evitarse la hidratación de las ampolletas liofilizadas mientras son selladas, manteniéndolas en un desecador con CaCl_2 .

2.5.4.6) Sellado de ampolletas.

Cada una de las ampolletas liofilizadas se sella bajo vacío con soplete de acetileno o de oxígeno-gas.

2.5.4.7) Revisión y selección de ampollitas.

Antes de almacenar las ampollitas con la cepa liofilizada, debe verificarse que el proceso haya sido adecuado y que las ampollitas estén en buenas condiciones para asegurar la supervivencia y estabilidad de las cepas durante el largo tiempo que este método promete conseguirlas.

Las características que deben verificarse son:

- a. La pureza de las cepas
- b. La viabilidad
- c. La estabilidad de las características macro y microscópicas, de cultivo y bioquímicas
- d. El vacío y el sellado de las ampollitas.

Las tres primeras se determinan en una muestra representativa de ampollitas que se hidratan para ello. El vacío y el sellado se verifican para cada ampollita.

A partir de la suspensión obtenida de las ampollitas rehidratadas:

- a. Se siembra en caldo nutritivo con extracto de levadura para verificar que no haya contaminación bacteriana. Si hubiera crecimiento en este medio, debe descartarse todo el lote de liofilizados.

b. Se hace una cuenta en placa, para determinar la viabilidad y asegurar que sea lo suficientemente alta, para conservar las ampollitas por largo tiempo. Además la viabilidad debe determinarse después, por lo menos cada seis meses, para prever oportunamente una nueva liofilización, antes de que la pérdida de viabilidad sea notable.

c. Se hace un cultivo para verificar características morfológicas macro y microscópicas e inocular los medios necesarios para la verificación de caracteres bioquímicos.

Para revisar el vacío y el sellado:

d. Se revisa cada ampollita con un generador de alta frecuencia, para verificar que esté al vacío, descartando las que tengan aire.

A continuación, se sumergen todas las ampollitas juntas en una solución colorida de fenol, se hace vacío en el kitasato que las contenga y después se rompe el vacío bruscamente para que la solución colorida penetre en las ampollitas mal selladas; desde luego, éstas se descartan.

Como en los métodos anteriores, los hongos liofilizados se almacenan a 4°C o a temperatura ambiente, preferiblemente en un cuarto oscuro para prevenir la acción de la luz. Los hongos se preservan en condiciones estables

por meses y en muchos casos por años.

Este método de preservación a largo plazo es conveniente para aquellos hongos que producen abundante esporulación; pero para aquellos que esporulan pobremente, la liofilización no es apropiada, ya que hay mortalidad durante el proceso. Otra objeción a este método es una posible infección del personal cuando se abren las ampollas -- liofilizadas, aunque este peligro puede reducirse colocando alrededor del punto de ruptura de la ampolla un algodón empacado con etanol al 70 %, o puede evitarse -- abriendo las ampollas en campanas de seguridad. La -- complejidad del proceso de liofilización y el requerimiento de aparatos costosos son otras desventajas de este método.

2.5.5 CONGELAMIENTO INTENSO.

Este método es satisfactorio para aquellos hongos que esporulan abundantemente. Se deben cultivar en medios -- apropiados como el Fitona-extracto de levadura agar o el Micofil agar durante 10 a 15 días aproximadamente; en algunos hongos se requiere más tiempo de incubación, hasta que los cultivos tengan una esporulación óptima.

Los cultivos maduros se colocan en un refrigerador a aproximadamente - 20°C y permanecen viables por años. - Aunque se han obtenido resultados variables respecto a -

la viabilidad de las cepas, este método se considera seguro para preservar cultivos de hongos por períodos hasta de seis meses.

La recuperación de las cepas se hace incubando los cultivos a 27°C. El calentamiento rápido de las esporas al final del congelamiento intenso facilita la supervivencia de los cultivos.

Al almacenar los cultivos a temperaturas tan bajas se minimizan la actividad celular y otras reacciones químicas que pueden llevarse a cabo.

Las desventajas de este método son: su alto costo, su ineficacia para conservar algunos hongos y la variación en la viabilidad.

2.5.6. ALMACENAMIENTO EN NITRÓGENO LÍQUIDO.

Con este método de preservación pueden mantenerse cultivos de hongos esporulantes y no esporulantes. Por lo general aquellos hongos que no resisten el proceso de liofilización pueden conservarse en nitrógeno líquido.

Las cepas se cultivan en medios sólidos o líquidos -- apropiados para obtener un buen desarrollo. Las esporas o fragmentos de micelio se cosechan por inundación de los cultivos en placas o tubos inclinados con glicerol al 10% o dietil sulfóxido al 5%. La superficie del cultivo se rasca suavemente con el asa estéril para desorentar esporas y/o fragmentos de micelio. Esta suspensión se envasa en viales estériles de borosilicato, previamente marcados con el número de cepa y fecha de almacenamiento, -

colocando 0.5 ml en cada uno; los viales se tapan con algodón. Para conservar algunos hongos que solo producen micelio, se cultivan en placas con un medio sólido apropiado y de las colonias formadas se remueven tres discos miceliales con un horadador estéril de 5 mm. Los discos se suspenden en un vial que contenga 0.4 ml de aditivo estéril. Los cultivos en medio líquido se centrifugan y las esporas y fragmentos de micelio se resuspenden en partes iguales de glicerol al 20% o de dimetilsulfóxido al 10% y medio de cultivo para dar una concentración final del 10% o 5% según el aditivo usado. De esta suspensión se transfieren a cada uno de los viales 0.5 ml.

Estos viales no se sellan para evitar el peligro que implica la manipulación de los hongos patógenos durante el proceso, ya que existe además el peligro de explosión durante el descongelamiento de las muestras.

Los viales se colocan en un congelador de nitrógeno líquido: la primera etapa del enfriamiento se lleva a cabo reduciendo $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $- 75^{\circ}\text{C}$; el enfriamiento final, hasta $- 196^{\circ}\text{C}$, es rápido y no es controlado. Todas las placas se almacenan en un refrigerador de nitrógeno líquido a aproximadamente $- 150^{\circ}\text{C}$.

Para restaurar los cultivos, se incuban en baño maría a 37°C con agitación rápida hasta que el material en los viales se descongele y se cultivan en un medio apropiado.

Los cultivos mantenidos en nitrógeno líquido pueden sobrevivir por años sin pérdida aparente de viabilidad. -

La variación que puede presentarse se debe a que la vele cidad de enfriamiento y calentamiento de las cepas son - factores importantes en su recuperación. Muchos culti-- vos requieren de un enfriamiento programado y otros so-- breviven después de un enfriamiento rápido.

Este método de preservación es muy costoso y puede -- dar lugar a pérdida de la viabilidad en algunas cepas.

2.5.7. ALMACENAMIENTO EN MATERIALES INERTES.

Este método consiste en secar a temperatura ambiente por medio de compuestos químicos como P_2O_5 y $CaCl_2$, sus-- pensiones de hongos impregnadas en papel filtro.

Sobre este método se han hecho las siguientes observa-- ciones: la lenta desecación a temperatura ambiente es me-- nos deseable que una desecación rápida por vacío o en un desecador con agentes químicos absorbentes de agua; la - leche o el suero parecen ser los mejores sustratos para suspender los cultivos de hongos, ya que mejoran el perío-- do de supervivencia; el tamaño de la muestra afecta la - viabilidad; y los discos con los cultivos secos sobrevi-- ven más tiempo almacenados en refrigeración que a tempe-- ratura ambiente.

Con este método se pueden conservar hongos esporulan-- tes y no esporulantes sin pérdida de viabilidad durante años, pero no existen reportes sobre la efectividad del método en la conservación de los hongos respecto a su --

morfología y propiedades fisiológicas.

2.5.8. ALMACENAMIENTO EN AGUA DESTILADA ESTÉRIL.

Este método propuesto por Castellani para conservar - cultivos de hongos a largo plazo, es muy simple y consiste en transferir inóculos moderadamente grandes de cultivos de hongos en Sabouraud dextrosa agar a tubos conteniendo de 6 a 10 ml de agua destilada estéril. Los tubos se tapan con torundas de algodón y se almacenan a temperatura ambiente.

Se debe tener cuidado de evitar la transferencia de - partículas de medio de cultivo junto con el inóculo, ya que pueden influir en el crecimiento de algunos hongos.

Los hongos permanecen viables después de un año de almacenamiento y posiblemente durante más tiempo si el agua que se evapora se reemplaza cada año. Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas permanecen sin alterarse.

El almacenamiento en agua destilada estéril evita el desarrollo de pleomorfismo, aunque no elimina esta tendencia que presentan muchos hongos, principalmente los dermatofitos, ya que una cepa pleomórfica conservada en agua destilada estéril permanece pleomórfica.

Las infestaciones con ácaros pueden erradicarse y evitarse al almacenar los cultivos de hongos en agua destilada estéril y en refrigeración.

Existe una modificación al método de Castellani, descrita por Benedek, que consiste en:

- reemplazar el agua destilada, que es hipotónica, por solución salina isotónica y

- reemplazar los tubos tapados con torundas, por frascos viales con tapón de roca.

Este método de conservación a largo plazo es sencillo, seguro puesto que las características originales de los hongos no se modifican, y barato ya que no se requiere de ningún equipo o aparato para su elaboración.

El objetivo de este trabajo es, precisamente, evaluar el método de Castellani, modificado por Benedek para conservar una subcolección de cepas de hongos pertenecientes al Cepario de la Facultad de Química, en vista de que sus ventajas son especialmente convenientes para los recursos y condiciones del Cepario.

3. MATERIALES Y METODOS.

Se trabajó con 20 cepas de hongos pertenecientes a 7 géneros. -
18 de estos hongos son saprófitos y 2 son patógenos.

La evaluación del método de conservación de hongos en solución -
salina estéril se hizo en tres etapas.

3.1 Determinación de las características de las cepas.

3.2 Conservación de las cepas en solución salina estéril.

3.3 Evaluación de la estabilidad de las cepas conservadas.

Además se hizo una colección de preparaciones permanentes de los
hongos estudiados.

MATERIALES.

- Material y equipo de laboratorio.

Tabos de ensayo de 13 x 100 mm

Tabos de ensayo de 16 x 150 mm

Tabos de ensayo de 22 x 150 mm

Matraces de bola de 1000 ml

Matraces de bola de 2000 ml

Vasos de precipitados de 100 ml

Vasos de precipitados de 250 ml

Matraces erlenmeyer de 250 ml

Probeta de 100 ml

Tubos de fermentación

Frascos de centrifuga de 250 ml

Frascos viales con tapón de rosca

Cajas de Petri

Portaobjetos

Cubreobjetos

Frascos goteros

Triángulos de varilla de vidrio

Tubos de vidrio doblados en ángulo recto

Aplicadores de varilla de vidrio

Pipetas de 1.0 ml

Pipetas de 10.0 ml

Pipetas Pasteur

Asa micrológica

Asa bacteriológica

Disturfi

Pinzas de disección

Pinzas de Kocher

Esponas de hule bihoradadas

Mangueras de hule

Machero

Emulsificador

Microscopio

Autoclave

Centrífuga con cubetal para los frascos de centrífuga

Asua de vacío

Campana para trabajar en área estéril

Estufa de 25°C

Estufa de 37°C.

- Medios de cultivo.

1. Sabouraud dextrosa agar.

Dextrosa 40 g
Polypeptona 10 g
Agar 15 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 5.6
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

2. Caldo dextrosa Sabouraud.

Dextrosa 20 g
Polypeptona 10 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 5.7
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

3. Papa dextrosa agar.

Infusión de papa 200 g
Dextrosa 20 g
Agar 15 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 5.6
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

4. Caldo papa dextrosa.

Infusión de papa 200 g
Dextrosa 20 g
Agua destilada 1000 ml

pH final 5.6

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

5. Infusión de papa.

Pulpa de papa 200 g

Agua 1000 ml

La pulpa de la papa se corta en cubos pequeños y se macera en 1000 ml de agua corriente durante una hora; -- luego se hierva por 5 min. Se filtra sobre algodón y gasa, ajustando el volumen del filtrado a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

6. Caldo extracto de malta.

Extracto de malta 17 g

Agua destilada 1000 ml

pH final 4.8

esterilizar a 121°C durante 15 min.

7. Agar nutritivo.

Extracto de carne 3 g

Peptona 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 ml

pH final 6.8

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

8. Caldo cerebro corazón.

Infusión de Cerebro de Ternera 200 g

Infusión de Corazón de Bue 250 g

Peptona 10 g

Cloruro de sodio 5 g
Fosfato disódico 2.5 g
Dextrosa 2.0 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 7.4
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

9. Agar almidón.

Peptona 5 g
Extracto de carne 3 g
Cloruro de sodio 5 g
Almidón 20 g
Agar 20 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 7.2
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

10. Gelatina nutritiva.

Peptona Gelysate 5 g
Extracto de carne 3 g
Gelatina 120 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 6.8-7.2
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

11. Caldo nitrato.

Peptona 5 g
Extracto de carne 3 g

Nitrato de potasio 1 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 7.0
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

12. Leche tornasol.

Leche descremada 100 g
Tornasol 0.75 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 6.8
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

13. Medio para hidrólisis de celulosa.

Fosfato dipotásico 1 g
Nitrato de sodio 0.5 g
Sulfato de magnesio 0.5 g
Cloruro de potasio 0.5 g
Sulfato ferroso 0.01 g
Agua destilada 1000 ml
pH final 7.5

Se colocan 9.0 ml del medio en tubos de 16 x 150 mm y se deposita dentro de cada tubo una tira de papel filtro (1 x 9 cm) permitiendo que se impregne con el medio. Los tubos se tapan con torundas de algodón y se esterilizan a 121°C durante 15 min.

- Reactivos y colorantes.

1. Agua glicerolosa al 10%.

Glicerina 10 ml
Agua destilada cbp 100 ml
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

2. Formol al 10 %.

Formol 10 ml
Agua destilada cbp 100 ml

3. Solución salina fisiológica.

Cloruro de sodio 0.85 g
Agua destilada cbp 100 ml
Esterilizar a 121°C durante 15 min.

4. Eritrocina al 2 %.

Eritrocina 2 g
Agua destilada cbp 100 ml

5. Fenol al 5 %.

Fenol 5 g
Agua destilada cbp 100 ml

6. Solución de lugol.

Iodo 1 g
Yoduro de potasio 2 g
Agua destilada 300 ml

7. Solución de ácido sulfanílico.

Acido acético glacial 100 ml
Acido sulfanílico 2.8 g
Agua destilada 250 ml

8. Solución de dimetil-alfa-naftilamina.

Acido acético glacial 100 ml
Dimetil-alfa-naftilamina 2.1 g
Agua destilada 250 ml

9. Goma cloral.

Hidrato de cloral 50 g
Goma arábica 30 g
Glicerina 20 ml
Agua destilada 50 ml

Se disuelve en frío el hidrato de cloral con un poco de agua destilada y se le añade la glicerina; se mezclan perfectamente. La goma arábica, bien molida se suspende en agua destilada formando una muflequita con gasa. Se deja que lentamente se disuelva y se le añade la mezcla de glicerina e hidrato de cloral.

10. Alcohol metílico.

11. Alcohol etílico.

12. Xilol.

13. Bálsamo de Canadá.

14. Sivo.

Arena

Papel china

Casa

Algodón

Etiquetas.

A continuación se describen los métodos utilizados en cada etapa.

3.1 Determinación de las características de las cepas.

La determinación de las características de las cepas parui-

te verificar su identidad en base a la literatura, y aporta - los datos de referencia para estudiar su estabilidad.

3.1.1. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS.

Para la identificación macroscópica se deben observar las siguientes características: velocidad de crecimiento, temperatura y tiempo de incubación, en un medio de cultivo determinado: forma, tamaño, aspecto y textura de la colonia, y coloración en la superficie y al reverso.

METODO.

Las cepas se recuerdan en medio de Sabouraud dextrosa agar, en tubo inclinado, tomando una pequeña porción de esporas y/o fragmentos de micelio de áreas de crecimiento activo (áreas jóvenes) con el asa micológica y depositando el inóculo en el centro de la superficie de agar; se siebra en un punto y por punción.

Los tubos se incuban a temperatura ambiente (27-28°C) y el desarrollo de la colonia se revisa diariamente por días o semanas hasta que haya esporulación abundante, para observar la velocidad de crecimiento, aspecto, textura, cambios de coloración en la superficie y al reverso de la colonia.

Es muy importante que el inóculo se tome de áreas de crecimiento activo para que el cultivo que se obtenga -

sea similar al original; ya que si se toma de áreas viejas, los productos acumulados del metabolismo fúngico - pueden ejercer una influencia mutagénica y dar lugar a cultivos pleomórficos, los cuales se deben descartar.

Si solo se obtienen cultivos pleomórficos debido a los múltiples subcultivos anteriores, la resienbra deberá hacerse en medios de cultivo pobres en nutrientes como son la papa dextrosa agar, papa-zenahoria agar, harina de raíz agar, etc, tomando el inóculo de un área donde no exista cambio pleomórfico para forzar la esporulación del hongo y tratar de recuperar las características originales. Posteriormente se subcultivan en Sabouraud para obtener un desarrollo similar al de la cepa original.

3.1.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.

Se deben observar las siguientes características microscópicas: tipo y tamaño del micelio; tipo, tamaño y forma de las esporas.

Para la identificación microscópica se emplea el microcultivo, que permite el crecimiento de los hongos sobre un portaobjetos. Esta técnica evita que las estructuras del hongo se modifiquen, permaneciendo sin alterarse las características de esporulación.

Es necesario escoger un medio de cultivo que promueva la esporulación del hongo, por ejemplo medios pobres en nutrientes, como la papa dextrosa agar.

ACTUO.

Se esterilizan cajas de Petri con un triángulo de varilla de vidrio, un portaobjetos y un cubreobjetos en su interior.

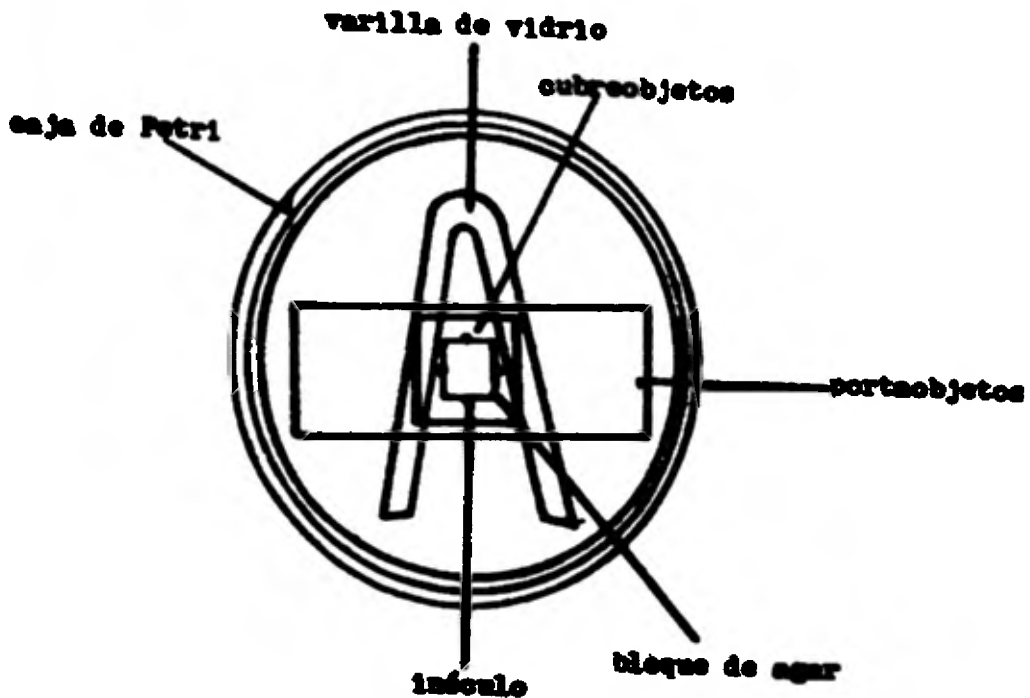
El medio de papa dextrosa agar se funde y se vierten de 15 a 20 ml en una caja de Petri estéril; se deja solidificar y se corta con ayuda de un bisturí, una cuadrícula de 1 cm de lado, quedando así bloques de agar para sembrar los hongos. Cada bloque de agar se saca con la ayuda de pinzas y se coloca en un extremo del portaobjetos que se encuentra dentro de la caja de Petri sobre la varilla de vidrio.

Se inoculan los cuatro lados del bloque de agar por picadura con esporas y/o fragmentos de micelio del cultivo envejecido para la identificación macroscópica. Con las pinzas, se coloca el cubreobjetos sobre el bloque de agar, aplicando una ligera presión para que se adhiera a su superficie. Se añaden 1 o 2 ml de agua glicerinada al 10 % estéril con objeto de mantener un medio ambiente húmedo. Se incuba a temperatura ambiente (27-28°C); si el agua se evapora, se deben añadir unas gotas más para evitar que el bloque de agar se seque (fig. 3.1).

El cultivo se observa periódicamente para detectar crecimiento y esporulación. Cuando esto sucede se coloca dentro de la caja una torunda de algodón saturada con formal al 10 % durante tres días para provocar la muerte del hongo.

El cubreobjetos se remueve con las pinzas y con el bisturí se desecha el bloque de agar adherido al porta o cubreobjetos, obteniéndose dos preparaciones microscópicas del hongo.

FIG. 3.1 MICROCULTIVO.



3.1.2.1

En algunos casos, específicamente en el estudio de Aspergillus niger, se dificultó la observación de las características microscópicas por que el color negro de las esporas no permite -- distinguir la vesícula sustentante a su alrededor las esterigmas, sino que da la impresión de

esporangios, como los del género Mucor.

Para eliminar este problema, los microcultivos no se tiñen con eritrocina, sino que se -- "aclaran" para observar las características microscópicas. Al clarificarse se puede observar la vesícula sosteniendo a su alrededor las estrigas que dan origen a las cadenas de conidias, característica del género Aspergillus. Los microcultivos se aclaran y montan con goma cloral; el hidrato de cloral permite el aclaramiento de las estructuras y con la goma arábiga las preparaciones se sellan.

3.1.2.2 Elaboración de una colección de preparaciones microscópicas permanentes de los hongos estudiados.

Se hicieron varias preparaciones de cada hongo estudiado, con el objeto de que se utilicen como material didáctico en la Facultad de Química.

Las preparaciones se fijan, tiñen y sellan -- para conservarlas permanentemente, rotuladas -- con el nombre del hongo.

MÉTODO.

Se hacen las preparaciones con la técnica -- del microcultivo (ver. 61); se fijan con alcohol metílico durante 10 min. Se tiñen con eritroci-

na durante 20 min y se lavan con agua corriente. Se aplica alcohol etílico y se deja secar; se aplica xilol y se deja secar. Finalmente se montan con bálsamo de Canadá, colocando encima un cubre o un portaobjetos, según el caso, de tal manera que no se formen burbujas de aire, y se rotulan las preparaciones con el nombre del hongo.

Para las preparaciones de Aspergillus niger, se pone una gota de goma cloral sobre el microcultivo y se coloca encima un cubre o un portaobjetos, según sea el caso, de tal manera que no se formen burbujas de aire.

3.1.3. CARACTERÍSTICAS BIQUÍMICAS.

Los hongos, a diferencia de las bacterias, no pueden identificarse y clasificarse mediante reacciones bioquímicas como es la fermentación de azúcares, pero puede ser de utilidad su acción enzimática sobre diferentes sustratos.

3.1.3.1 Actividad amilolítica.

Se determina en placas de agar almidón, revelando con lugol.

MÉTODO.

El hongo se siembra en un punto y por pun---

ción en el centro de una caja de Petri con agar almidón. Se incuba a temperatura ambiente (27-28°C) durante 10 a 15 días, hasta obtener una esporulación abundante. Para observar el resultado, se cubre la superficie de la placa con lygol; una zona clara alrededor de la colonia indica hidrólisis del almidón por acción de la amilasa; la zona coloreada de azul indica que no hubo hidrólisis.

3.1.3.2 Actividad celulolítica.

La actividad celulolítica del hongo se determina por su crecimiento en un medio que contiene sales nutritivas, una fuente de nitrógeno inorgánico y papel filtro como única fuente de carbono.

Método.

Los tubos con medio de sales y tira de papel filtro, se inoculan con fragmentos de micelio y esporas y se incuban a temperatura ambiente (27-28°C) hasta obtener desarrollo. Conviene mantener los tubos en posición inclinada para tener mayor superficie de contacto. Los tubos se observan periódicamente hasta los 30 días de incubación.

La hidrólisis de la celulosa se determina --

cuando al agitar los tubos, el papel filtro se desintegra o se rompe a la mitad.

3.1.3.3 Actividad proteolítica.

a) Hidrólisis de gelatina.

La gelatina es una proteína formada por - desnaturalización del colágeno que puede ser degradada por la acción de una proteasa.

METODO.

El hongo se siembra por picadura en tubos con gelatina nutritiva y se incuba a temperatura ambiente (27-28°C) durante 10 a 15 días. Se consideran negativos los tubos que permanezcan sólidos, en tanto que la gelatina hidrolizada permanece líquida, indicando actividad proteolítica.

b) Leche tornasolada.

La actividad proteolítica puede determinarse en leche, mediante la coagulación de la caseína, que puede degradarse hasta amoníaco y CO₂ cuando la proteólisis es considerable. La ruptura del coágulo formado se debe a la acumulación de gas.

En la leche tornasolada también se determina actividad sacarolítica, por la fermentación

ción del azúcar de la leche, en la cual se produce ácido (ácido láctico) o ácido y gas.

METODO.

Se inoculan los tubos con las cepas de hongos y se incuba a temperatura ambiente (27-28°C) hasta observar cambios en la leche (10 a 15 días). Se mantienen los tubos en posición inclinada para favorecer la aireación del cultivo. Se observan los cambios que ocurren en la leche: coagulación, reptonización (disolución del coágulo), acidez o alcalinidad, desprendimiento de gases.

2.1.3.4 Reducción de nitratos.

La reducción de nitratos a nitritos es un proceso que se lleva a cabo por la enzima reductasa de nitrato, que poseen ciertos hongos.

METODO.

Se cultiva el hongo en caldo nitrato durante 10 a 15 días a temperatura ambiente (27-28°C) en posición inclinada para aumentar la superficie de contacto. Se toma una pequeña muestra del cultivo o se añaden directamente al tubo unas gotas de ácido sulfanílico y unas gotas de dimetil-alfa-naftilsrina. La aparición de una

coloración rosa a roja indica que el nitrato -- fue reducido a nitrito. Se hace un blanco.

Puede suceder que el organismo reduzca también los nitritos a nitrógeno o amoníaco; por ello cuando la reacción es negativa, se agrega zinc para reducir el nitrato remanente a nitrito y entonces determinar si la prueba es negativa o si los nitritos también fueron reducidos.

3.1.3.5 Antibiosis.

Esta prueba se efectuó únicamente para la cepa de Penicillium registrada como aislada del suelo, antibiosis contra organismos grampositivos.

METODO.

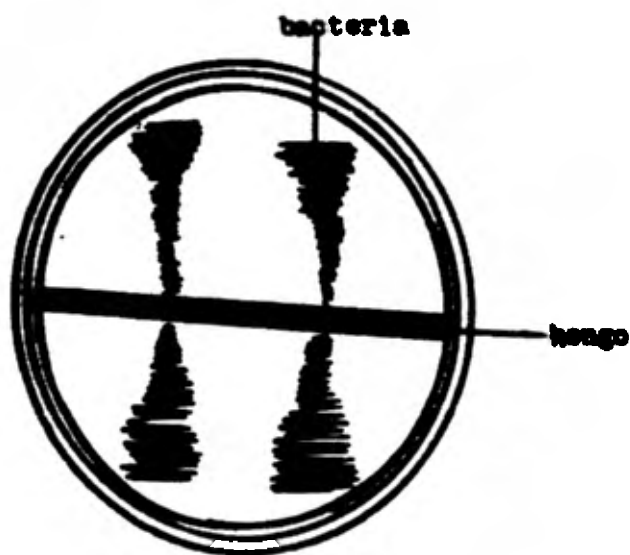
El hongo se siembra en la parte central de una caja de Petri con agar nutritivo, formando una línea; se incuba a temperatura ambiente hasta obtener un buen desarrollo (8 días) y posteriormente se siembran por estría las bacterias a probar; se incuba a 37°C durante 24 a 48 horas y se observa la inhibición del crecimiento bacteriano (fig. 3.2).

Bacterias grampositivas: S. aureus, S. faecalis, B. pasteurianus, B. subtilis y M. luteus.

Bacterias gramnegativas: E. coli, S. typhosa.

3. dysenteriae, P. aeruginosa y P. vulgaris.

FIG. 3.2



3.2 Conservación de las ceras en solución salina estéril.

3.2.1. Obtención de cultivos con abundante esporulación.

La esporulación de los hongos depende en gran medida del sustrato, por tanto, un medio de cultivo apropiado para esporulación es aquel donde se obtiene crecimiento micelial mínimo acompañado por máximo desarrollo de las estructuras de reproducción.

Se probaron tres medios de cultivo con valor nutritivo relativamente bajo para inducir la esporulación de -

los hongos y determinar cual permite la mayor esporulación posible. Además se probaron medios de cultivo líquidos y sólidos para determinar en que forma se facilitaba más la obtención de la suspensión de esporas. Los medios de cultivo probados fueron:

Infusión de papa

Caldo papa dextrosa

Caldo extracto de malta

Papa dextrosa agar.

Los hongos se cultivaron en frascos de centrifuga, - en lugar de tubos para reducir así el número de cultivos necesarios para obtener suficiente suspensión de esporas y también reducir un factor muy importante, que es la variación de desarrollo que puede existir entre diferentes cultivos.

La cantidad óptima de medio de cultivo en cada frasco fue de 100 ml y se probaron las siguientes cepas: Aspergillus niger, Penicillium sp., Stizyria sp. y Cestri-
thia sp.

METODO.

Los frascos se inoculan con cultivos maduros (15 a - 20 días de incubación), teniendo cuidado de que el tamaño del inóculo sea moderado y provenga de áreas jóvenes de crecimiento activo para asegurar que el desarrollo que se obtenga sea similar al del cultivo original. Los frascos con medio líquido se inclinan para que haya ma-

por superficie de contacto entre el hongo y el medio de cultivo y mayor aireación. Se incuban a temperatura ambiente (27-28°C) y cuando se tiene una esporulación abundante, después de 10 días de incubación aproximadamente, se procede a hacer la suspensión de esporas.

3.2.2. Preparación de la suspensión de esporas.

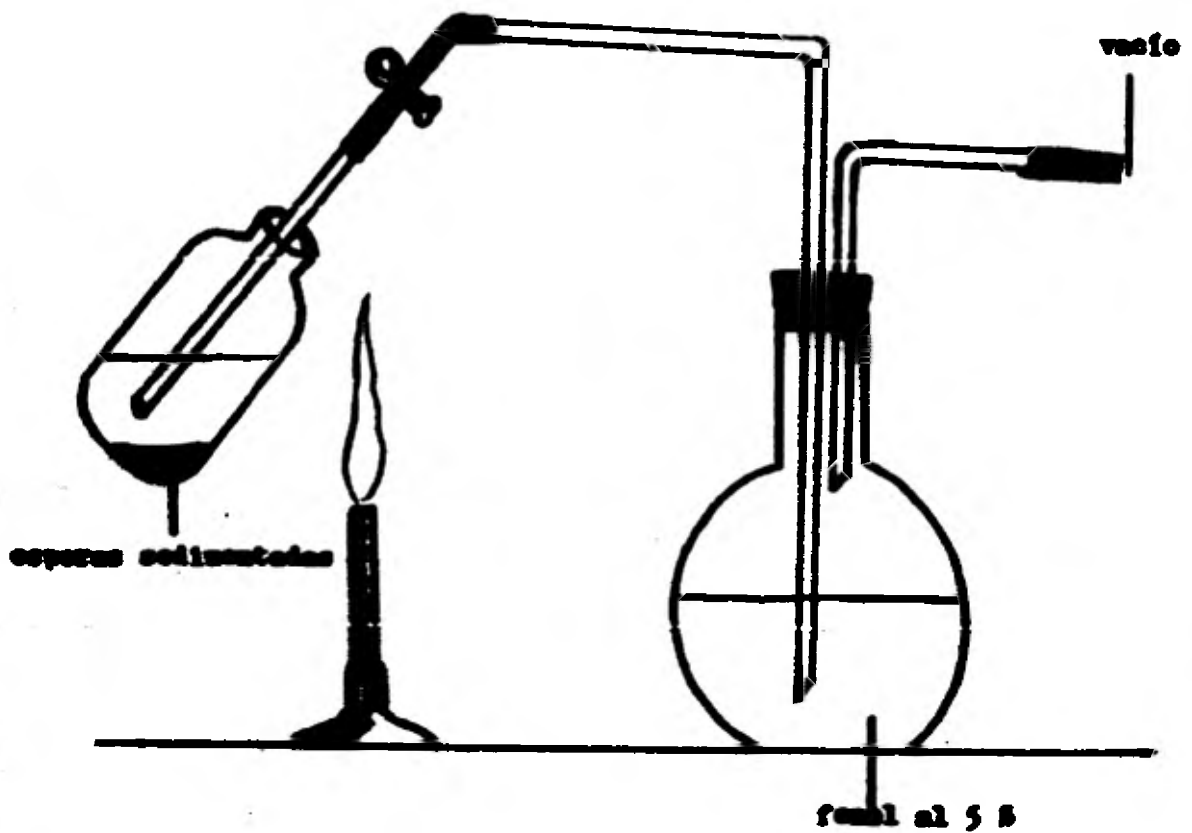
Para preparar la suspensión de esporas es necesario que los cultivos estén completamente maduros y posean buena esporulación. La suspensión se hace con solución salina isotónica en lugar de agua destilada, modificación hecha por Benedek al método de Castellani para conservar cultivos de hongos.

METODO.

Cuando el cultivo está en medio líquido, se agitan los frascos para desprender las esporas de la masa micelial; se dejan reposar durante 30 min para evitar la proyección de aerosoles y con la ayuda de pinzas estériles se retira la masa micelial que se esteriliza para evitar contaminación. Los frascos se centrifugan 30 min a 3000 rpm, o bien se dejan sedimentar las esporas durante 48 a 72 h. El medio de cultivo se decanta por succión con vacío (fig. 3.3). Se hace un lavado de las esporas sedimentadas con solución salina fisiológica para eliminar residuos de medio que puedan interferir en el análisis

namiento. Se utilizan 40 ml de solución salina para hacer el lavado en cada frasco; se centrifuga o se dejan sedimentar las esporas. El líquido sobrenadante se elimina por succión con vacío y se recoge en un matraz que contiene solución de fenol al 5% para evitar contaminación con las esporas que puedan transferirse.

FIG. 3.3



Para hacer la suspensión final de esporas se añade suficiente solución salina estéril para lograr una concentración de por lo menos 10^6 esporas/ml, es decir que se añaden entre 40 y 60 ml de solución salina estéril, dependiendo de la cantidad de esporas presentes.

Cuando el cultivo está en medio sólido se añaden de 40 a 60 ml de solución salina estéril a los cultivos, dependiendo del desarrollo obtenido. La suspensión de esporas se puede hacer de dos maneras: por agitación de los cultivos con arena estéril, o por raspado del crecimiento con piveta o con asa micológica.

a. Por agitación con arena estéril:

La arena debe ser tamizada para obtener partículas de un solo tamaño. Estas deben ser relativamente grandes para poder desprender las esporas de la masa micelial. Se añaden unos 6 g de arena. La arena se coloca en tubos angostos (de fermentación) tapándolos con papel china, de tal forma que pueda desprenderse fácilmente para dar salida a la arena. Este tubo se introduce boca abajo en otro más grande (16 x 150 mm), se tapa con algodón y se esteriliza. Para añadir la arena, el tubo de fermentación se saca en condiciones asépticas y se desprende el papel china, para vaciar la arena en el cultivo; se agrega la solución salina estéril y se tapan los frascos. Se agitan con cuidado.

do para desprender únicamente las esporas de la masa micelial y evitar que se rompa el agar. Se dejan reposar de 20 a 30 min para evitar la proyección de aerosoles que se forman al agitar los frascos. La suspensión resultante se transfiere a los viales de almacenamiento.

b. Por raspado con pipeta o asa:

La solución salina estéril se adiciona y las esporas y/o fragmentos de micelio se desprenden por raspadura ligera de la superficie del cultivo con la misma pipeta o bien con el asa micológica, teniendo cuidado de no romper el agar. La suspensión resultante se transfiere a los viales de almacenamiento.

La ventaja de emplear un medio líquido para el cultivo de los hongos es que elimina la transferencia de nutrientes que puedan ir adheridos al micelio y/o esporas al hacer la suspensión, y que pueden influir en el crecimiento del hongo o faciliten el pleomorfismo durante el almacenamiento en solución salina. Tiene la desventaja de que los frascos tienen que agitarse muy vigorosamente y puede haber proyección de aerosoles aún después de resacar los frascos y se corre el peligro de contaminación.

En el medio sólido, la agitación vigorosa con arena provoca también el rozamiento del agar y por consiguiente, la transferencia de partículas del medio a la sus-

pensión de esporas; durante el almacenamiento este medio puede influir en el crecimiento del hongo, facilitando el pleomorfismo. Por tanto, la suspensión de esporas se prefiere hacer mediante raspadura ligera de la superficie del cultivo con el asa estéril o con la misma pipeta que se añadió la solución salina.

3.2.3. Envasado de la suspensión.

Es en esta operación en la que Benedict introdujo dos modificaciones al método de Castellani: en lugar de agua destilada, empleó solución salina fisiológica para obtener la suspensión de esporas; y en lugar de usar tubos convencionales tapados con algodón, para almacenar la suspensión, empleó frascos viales con capacidad aproximada de 6.0 ml y tapones de roca. Los frascos viales deben ser gruesos para reducir la probabilidad de que se rompan; por su tamaño se requiere poco espacio para su almacenamiento; y el material del tapón debe ser resistente al calor de la esterilización. Además ni el tapón ni el empaque deben ser tóxicos para las esporas almacenadas. Este problema se presentó con esporas de Aspergillus que después de dos meses de almacenamiento parecían sin causa aparente.

Se demostró que los tapones de roca fueron los responsables, ya que al esterilizar los frascos viales y destaparlos, se desprendía un olor semejante al del formal. Se colocaron por separado frascos y tapones en b2

tes con agua corriente durante tres días, pero no se logró eliminar el peculiar olor. Se procedió entonces a utilizar otros tapones de rosca que no desprendieran vapores tóxicos por efecto de la esterilización.

Para el envasado, los viales se identifican debidamente, colocándoles una etiqueta con el nombre de la cepa (género y/o especie) a que pertenecen.

Después de haber efectuado un lavado con solución salina estéril de la suspensión de esporas resultante, para eliminar la transferencia de partículas de medio de cultivo, se añaden 3.0 ml de esta suspensión a cada vial; se aprieta el tapón para evitar la evaporación del agua y se almacenan en la obscuridad a temperatura ambiente. Se prepararon 50 viales de cada cepa.

3.3 Evaluación de la estabilidad de las cepas conservadas.

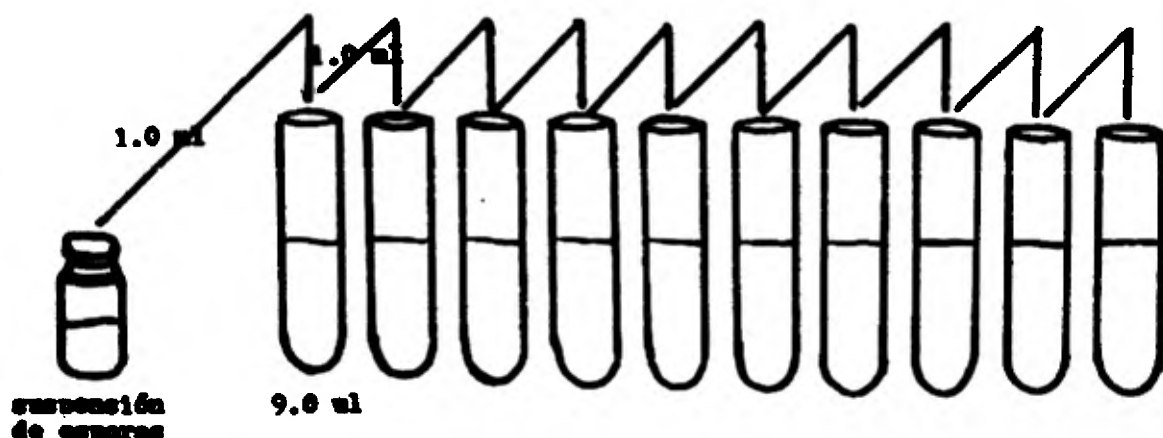
Antes de proceder al almacenamiento se determinó la viabilidad de la suspensión de esporas en una muestra de cinco viales.

La viabilidad de los hongos se evalúa en forma semicuantitativa y se compara con la que se obtenga después del almacenamiento a diferentes intervalos para valorar así la eficacia del método para preservar cultivos de hongos a largo plazo.

MÉTODO.

Se hacen diluciones a partir de la suspensión original hasta 10^{-10} en solución salina fisiológica (fig. 3.4).

FIG. 3.4



Se prueban las diluciones siguientes: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} , además de la suspensión original.

La viabilidad se evalúa colocando 3 gotas de la suspensión original, o de la dilución que corresponda, en una caja de Petri con medio de Sabouraud dextrosa agar. La caja se inclina permitiendo que las gotas corran a través de la superficie de agar y se formen 3 líneas. Además se siembran 2 gotas de la suspensión en un tubo con 10 ml de Caldo Sabouraud, para detectar crecimiento vívido.

Cada 24 horas se revisa el crecimiento de los cultivos, hasta observar el inicio de su esporulación. Se cuentan las colonias formadas y se evalúa de la siguiente manera:

Desarrollo abundante	excelente (E)
50 a 100 colonias/línea	Muy bueno (MB)
10 a 50 colonias/línea	Bueno (B)
5 a 10 colonias/línea	Regular (R)
10 o menos colonias/placa	Pobre (P)
Crecimiento solo en caldo	Solo en caldo (SC)
Ningún crecimiento, ni en agar ni en caldo.	Nada (N)

Los cultivos que den un rango menor que R no se consideran satisfactorios para el tiempo que se están probando, y el método de preservación no es recomendable, teniendo que recurrir a otro más apropiado.

3.3.1. Pureza.

Para descartar la posibilidad de contaminación bacteriana en los viales, se depositan 2 o 3 gotas de la suspensión de esporas en Caldo Cerebro Corazón y se incuban a 37°C durante 72 h. Si hay bacterias presentes en la suspensión, se descartan los viales y el proceso de conservación se debe iniciar nuevamente.

No se consideró conveniente la práctica de suspender las esporas en solución de penicilina y estreptomina durante 24 h, antes del envasado, para prevenir la contaminación bacteriana ya que el uso de medios o métodos selectivos, como es el caso, puede enmascarar las contg

minaciones haciendo que pasen inadvertidas.

El tener cultivos contaminados y no percatarse de --
ello, sería absolutamente indeseable en un Cepario, por
lo que se establece como regla general, que todo culti-
vo debe estar puro y pasar satisfactoriamente todas las
pruebas correspondientes, antes y durante la conserva--
ción. De no ser así, debe purificarse antes de someter
lo a conservación o desecharse todo el lote y repetir -
el proceso cuando el cultivo pase satisfactoriamente to-
das las pruebas de pureza.

4. RESULTADOS.

4.1 verificación del género y especie de las cepas de hongos estudiadas antes y después del período de conservación en el método seguido.

4.1.1 Género Aspergillus.

4.1.1.1 Aspergillus flavus (patógeno).

Se verificó su identidad.

4.1.1.2 Aspergillus fumigatus (patógeno).

Se verificó su identidad.

4.1.1.3 Aspergillus ochraceus.

Se verificó su identidad.

4.1.1.4 Aspergillus niger.

Se verificó su identidad.

4.1.1.5 Aspergillus niger EN-1.

Se verificó su identidad.

4.1.1.6 Aspergillus niger EN-2.

Se verificó su identidad.

4.1.1.7 Aspergillus niger EN-3.

Se verificó su identidad.

4.1.1.8 Aspergillus niger (Cena #5).

Se verificó su identidad.

4.1.2. Género Penicillium.

4.1.2.1 Penicillium notatum.

Se verificó su identidad.

4.1.2.2 Penicillium sp. (productor de antibiótico, cepa # 13).

Se verificó su identidad.

4.1.2.3 Penicillium sp. (productor de antibiótico, cepa # 16).

Se verificó su identidad.

4.1.2.4 Penicillium sp.

Se verificó su identidad.

4.1.2.5 Penicillium sp. (aislado del suelo).

Se verificó su identidad. Se tenía información no confirmada de que esta cepa producía antibióticos, por lo que se realizaron las pruebas de antibiosis descritas en la técnica No. 3.1.3.5.

4.1.2.6 Penicillium sp. (aislado de lácteos en descomposición).

Se verificó su identidad.

4.1.3 Género Geotrichum.

4.1.3.1 Geotrichum sp.

Se verificó su identidad.

4.1.4 Género Penicillium.

4.1.4.1 Penicillium sp.

Esta cepa estaba clasificada como Aspergillus flavus, pero la morfología no correspondía al género Aspergillus. La identificación de la cepa en el género Penicillium se basó principalmente en las características microscópicas: estructuras de reproducción.

4.1.5 Género Alternaria.

4.1.5.1 Alternaria sp.

Se verificó su identidad.

4.1.6 Género Helminthosporium.

4.1.6.1 Helminthosporium sp.

Se verificó su identidad.

4.1.7 Género Rhizopus.

4.1.7.1 Rhizopus oligosporum.

Se verificó su identidad.

4.1.7.2 Rhizopus sp.

Esta cepa estaba clasificada como Mucor sp.

Ambos géneros son semejantes macroscópicamente, pero difieren microscópicamente, porque Rhizopus presenta estolones, esporangióforos no ramificados y rizoides (hifas en forma de raíz), siendo los rizoides, las principales estructuras por las que se diferencian estos dos géneros y en las que se basó su identificación.

4.2 Conservación de las cepas en solución salina estéril.

4.2.1 Obtención de cultivos con abundante esporulación.

Los resultados que se obtuvieron con las cepas de hongos probadas en los medios de cultivo que se usaron para obtener una esporulación abundante fueron los siguientes:

A los cinco días de incubación.

CENSA	MEDIO DE CULTIVO			
	Caldo extracto de malta	Caldo papa dextrosa.	Infusión de papa.	Papa dextrosa agar.
<u>Aspergillus niger.</u>	++	++	+	++
<u>Penicillium sp.</u>	++	++	+	++
<u>Mucor sp.</u>	+	+	+	++
<u>Geotrichum sp.</u>	+	+	+	++

A los 10 días de incubación.

<u>A. niger.</u>	+++	++++	++	++++
<u>Penicillium sp.</u>	+++	+++	++	+++
<u>Mucor sp.</u>	+++	++++	++	++++
<u>Geotrichum sp.</u>	+++	+++	++	+++

A los 15 días de incubación no se obtuvo variación en el desarrollo de los cultivos. Los medios más erectivos para producir esporulación abundante fueron el caldo extracto de malta, caldo papa dextrosa y papa dextrosa agar; el medio de infusión de papa fue el que produjo menor -- cantidad de masa micelial, pero la esporulación no fue -- muy abundante.

El medio que se consideró el más adecuado para obtener

cultivos con abundante esporulación fue el de papa dextrosa agar.

4.2.2 Preparación de la suspensión de esporas.

La suspensión de esporas en solución salina estéril -- se hizo por raspadura ligera del crecimiento con pipeta o asa micológica, añadiendo entre 40 a 60 ml de solución salina estéril para obtener una concentración de por lo menos 10^6 esporas/ml.

Los resultados que se obtuvieron con A. niger y Penicillium sp fueron los siguientes:

A. niger

Suspensión de esporas con 60 ml de solución salina estéril.

Dilución	Tipo de desarrollo
Suspensión original	excelente
10^{-2}	excelente
10^{-4}	excelente
10^{-6}	excelente
10^{-8}	Aprox. 50 colonias/línea
10^{-10}	Aprox. 60 colonias/línea

Una línea proviene de una gota de la suspensión o dilución, y es aproximadamente igual a 0.05ml.

Si en la dilución 10^{-10} hay 60 colonias/línea:

60 colonias ----- 0.05 ml
X ----- 1.0 ml
 $N=1200$ colonias/ml en la dilución 10^{-10} .
Por tanto, en la suspensión original hay:
 $1200 \times 10^{-10} = 12 \times 10^{12}$ esporas/ml.

Penicillium sp.

Suspensión de esporas con 50 ml de solución salina estéril.

Dilución	Tipo de desarrollo
Suspensión original	Excelente.
10^{-2}	Excelente.
10^{-4}	Aprox. 100 colonias/línea
10^{-6}	Aprox. 60 colonias/línea.
10^{-8}	Aprox. 25 colonias/línea.
10^{-10}	Ningún crecimiento.

Si en la dilución 10^{-8} existen 25 colonias/línea:

25 colonias ----- 0.05 ml
X ----- 1.0 ml
 $N=500$ colonias/ml en la dilución 10^{-8} .
Por tanto, en la suspensión original hay:
 $500 \text{ colonias} \times 10^{-8} = 5 \times 10^{10}$ esporas/ml.

4.3 Determinación de la viabilidad y actividad bioquímica.

La viabilidad de los hongos almacenados en solución salina estéril se determinó al mes, dos meses, tres meses, seis meses

y 24 meses de almacenamiento. Esta se determina hasta que la esporulación se inicia; además se determina su pureza y la conservación de sus características morfológicas y bioquímicas.

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Aspergillus flavus</u> (patógeno).					
Fecha de siembra. 21/Septiembre/1979			Fecha de cosecha. 8/Octubre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 3 meses	6 meses	29 meses
Suspensión de esporas	±	±	±	±	±
Dilución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁴	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁸	±	±	±	±	±
" 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Aspergillus fumigatus</u> (patógeno).					
Fecha de siembra. 19/Octubre/1979			Fecha de cosecha. 29/Octubre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	5 meses	25 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	+	+
Dilución 10 ⁻²	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁶	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁸	+	+	+	+	+
" 10 ⁻¹⁰	+	+	+	+	+
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" relativa	+			+	+
Leche tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación prod. de gas	Alcalinidad Coagulación prod. de gas
reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Aspergillus ochraceus.</u>					
Fecha de siembra. 13/Octubre/1979			Fecha de cosecha. 30/Octubre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	5 meses	25 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	+	+
Dilución 10^{-2}	+	+	+	+	+
" 10^{-4}	+	+	+	+	+
" 10^{-6}	+	+	+	+	+
" 10^{-3}	+	+	+	+	+
" 10^{-10}	+	+	+	+	+
PUREZA	satisfactoria	Satisf.	satisf.	satisf.	satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	satisfactorias	Satisf.	satisf.	satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA.					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasoleada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la ceca. <u>Aspergillus niger.</u>					
Fecha de siembra. 17/Septiembre/1979			Fecha de cosecha. 2/Octubre/1979		
VIAJILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 3 meses	5 meses	29 meses
Suspensión de esporas	±	±	±	±	±
Disolución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁴	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁸	±	±	±	±	±
" 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
FORMA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas	Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Aspergillus niger</u> 23-1.					
Fecha de siembra. 17/Septiembre/1979			Fecha de cosecha. 2/Octubre/1979		
VIAJILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 3 meses	5 meses	29 meses
Suspensión de esporas	±	±	±	±	±
Dilución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁴	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
" 10 ⁻³	±	±	±	±	±
" 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas	Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DAOS DE CONSERVACION.

Nombre de la ceba. <u>Aspergillus niger</u> 24-2.					
Fecha de siembra. 17/Septiembre/1979			Fecha de cosecha. 5/Octubre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 3 meses	5 meses	29 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	-	+
Dilución 10 ⁻²	+	-	+	+	+
" 10 ⁻⁴	+	+	-	-	+
" 10 ⁻⁶	+	-	-	-	+
" 10 ⁻⁸	+	+	-	-	-
" 10 ⁻¹⁰	+	+	+	-	+
PUSIZA	satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
SIGUIENTE					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche termalizada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
reducción nitrosos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Aspergillus niger</u> M-7.					
Fecha de siembra. 17/Septiembre/1979			Fecha de cosecha. 5/Octubre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 3 meses	5 meses	29 meses
suspensión de esporas	±	±	±	±	±
dilución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
- 10 ⁻⁴	±	±	±	±	±
- 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
- 10 ⁻⁸	±	±	±	±	±
- 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Aspergillus niger</u> (cepa #5).					
Fecha de siembra. 14/enero/1980			Fecha de cosecha. 29/enero/1980		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	3 meses	25 meses
suspensión de esporas	±	±	±	±	±
Dilución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁴	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
" 10 ⁻³	±	±	±	±	±
" 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
PANAZA	Satisfactoria	satisf.	satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	Satisfactorias	satisf.	satisf.	satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasola	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas	Acidez Coagulación Prod. de gas
reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Penicillium notatum.</u>					
Fecha de siembra. 18/Octubre/1979			Fecha de cosecha. 29/Octubre/1979		
VIALIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	6 meses	28 meses
Suspensión de esporas	E	E	E	E	E
Dilución 10⁻²	E	E	E	E	MB
• 10 ⁻⁴	E	E	E	E	B
• 10 ⁻⁶	E	E	E	E	B
• 10 ⁻⁸	E	E	E	E	B
• 10 ⁻¹⁰	E	E	E	E	P
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
• celulosa	-			-	-
• gelatina	+			+	+
Leche torneolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas	Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

LABOS DE CONSERVACION.

Nombre de la ceca. Penicillium sp. (productor de antibiótico, ceca #17).

Fecha de siembra. 28/Febrero/1980

Fecha de cosecha. 17/Marzo/1980

VIABILIDAD

	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	27 meses
Suspensión de esporas	E	E	E	Micelio estéril
Dilución 10 ⁻²	E	E	E	Micelio estéril
• 10 ⁻⁴	E	E	E	Micelio estéril
• 10 ⁻⁶	E	E	NB	Micelio estéril
• 10 ⁻⁸	E	E	NB	Micelio estéril
• 10 ⁻¹⁰	E	E	NB	Micelio estéril

PUREZA Satisfactoria Satisf. Satisf. Satisf.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Satisfactorias Satisf. Satisf.

BIOQUIMICA

Hidrólisis almidón	+
• celulosa	-
• gelatina	-
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cebra. <u>Penicillium sp.</u> (productor de antibiótico, cebra #16).				
Fecha de siembra. 28/Febrero/1980		Fecha de cosecha. 17/Marzo/1980		
VIABILIDAD				
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	27 meses
Suspensión de esporas	±	±	±	Micelio estéril
Dilución 10 ⁻²	AB	AB	AB	Micelio estéril
" 10 ⁻⁴	AB	AB	AB	Micelio estéril
" 10 ⁻⁶	B	B	B	Micelio estéril
" 10 ⁻⁸	B	B	B	Micelio estéril
" 10 ⁻¹⁰	B	B	B	Micelio estéril
PUERZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	
BIOQUÍMICA				
Hidrólisis almidón	-			
" celulosa	-			
" gelatina	+			
Leche tornesolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			
Reducción nitritos	-			

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Penicillium sp.</u>					
Fecha de siembra. 14/enero/1940			Fecha de cosecha. 29/enero/1940		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	3 meses	25 meses
Suspensión de esporas	a	b	a	c	a
Dilución 10^{-2}	b	b	b	a	no
" 10^{-4}	c	c	c	c	b
" 10^{-6}	a	c	c	c	b
" 10^{-8}	a	c	c	c	a
" 10^{-10}	c	c	c	c	B
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA					
Hidrólisis almidón	-			-	-
" celulosa	-			-	-
" gelatina	+			+	+
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas	Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Penicillium</u> sp. (aislado del suelo).				
Fecha de siembra. 6/Febrero/1980		Fecha de cosecha. 22/Febrero/1980		
VIABILIDAD				
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	24 meses
Suspensión de esporas	E	E	3	E
Dilución 10 ⁻²	E	E	E	E
" 10 ⁻⁴	E	E	E	E
" 10 ⁻⁶	E	E	E	E
" 10 ⁻⁸	E	E	E	P
" 10 ⁻¹⁰	E	E	E	P
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA				
Hidrólisis almidón	-			-
" celulosa	-			-
" gelatina	+			+
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas
Reducción de nitratos	-			-

CONT.

CCMF. Penicillium sp. (aislado del suelo).

ANTIBIOSIS

	Al envasar	1 mes	despues de 2 meses	24 meses
Bacterias grampositivas:				
<i>S. aureus</i>	+			
<i>S. faecalis</i>	-			
<i>B. megaterium</i>	-			
<i>S. subtilis</i>	-			
<i>S. luteus</i>	-			
Bacterias gramnegativas:				
<i>E. coli</i>	-			
<i>S. typhosa</i>	-			
<i>S. dysenteriae</i>	-			
<i>P. aeruginosa</i>	-			
<i>P. vulgaris</i>	-			

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Penicillium sp.</u> (aislado de lácteos en descomposición).				
Fecha de siembra. 6/Febrero/1950		Fecha de cosecha. 22/Febrero/1950		
VIABILIDAD				
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	24 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	+
Dilución 10 ⁻²	+	+	-	+
" 10 ⁻⁴	+	+	+	+
" 10 ⁻⁶	+	+	+	+
" 10 ⁻⁸	+	-	+	R
" 10 ⁻¹⁰	+	+	+	P
PUREZA	satisfactoria	satisf.	satisf.	satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	satisfactorias	satisf.	satisf.	satisf.
BIOQUIMICA				
Hidrólisis almidón	+			+
" celulosa	-			-
" gelatina	-			-
Leche tornasolada	Acidez Coagulación Prod. de gas			Acidez Coagulación Prod. de gas
reducción nitratos	-			-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Gestrichum sp.</u>					
Fecha de siembra. 15/Noviembre/1979		Fecha de cosecha. 5/Diciembre/1979			
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	decaída de 2 meses	5 meses	27 meses
Suspensión de esporas	±	±	±	±	±
Dilución 10 ⁻²	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁴	±	±	-	±	±
" 10 ⁻⁶	±	±	±	±	±
" 10 ⁻⁸	±	±	±	±	±
" 10 ⁻¹⁰	±	±	±	±	±
PUREZA	satisfactoria	Satisf.	satisf.	satisf.	satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS.	satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	satisf.
BIOQUÍMICA					
hidrólisis almidón	-	-	-	-	-
" celulosa	-	-	-	-	-
" gelatina	+	+	+	+	+
Leche torresolada	Coagulación			Coagulación	Coagulación
Reducción nitritos	-	-	-	-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cena. <u>Paezilomyces sp.</u>				
Fecha de siembra. 6/Febrero/1980		Fecha de cosecha. 26/Febrero/1980		
VIABILIDAD				
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	24 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	Micelio estéril
Dilución 10^{-2}	+	+	+	Micelio estéril
" 10^{-4}	-	+	MB	Micelio estéril
" 10^{-6}	+	+	+	Micelio estéril
" 10^{-8}	+	+	+	Micelio estéril
" 10^{-10}	+	+	R	Micelio estéril
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	
BIOQUÍMICA				
Hidrolisis almidón	-			
" celulosa	-			
" gelatina	-			
Lече tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			
Reducción nitratos	-			

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Alternaria sp.</u>				
Fecha de siembra. 15/Octubre/1979		Fecha de cosecha. 30/Octubre/1979		
VIAJILIDAD				
	Al envasar	2 meses	después de 6 meses	25 meses
Suspensión de esporas	c	c	c	c
Dilución 10 ⁻²	M3	M3	M3	P
" 10 ⁻⁴	R	P	P	x
" 10 ⁻⁶	R	P	r	N
" 10 ⁻³	R	N	N	N
" 10 ⁻¹⁰	P	N	N	N
FUERZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA				
Hidrólisis almidón	+		+	+
" celulosa	-		-	-
" gelatina	-		-	-
Leche tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas		Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-		-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cena. <u>Helminthosporium sp.</u>				
Fecha de siembra. 15/Octubre/1979		Fecha de cosecha. 30/Octubre/1979		
VIABILIDAD				
	Al envasar	2 meses	después de 6 meses	28 meses
Suspensión de esporas	E	E	E	E
Dilución 10 ⁻²	E	E	E	P
" 10 ⁻⁴	E	P	P	P
" 10 ⁻⁶	B	P	P	N
" 10 ⁻⁸	E	P	P	N
" 10 ⁻¹⁰	E	N	N	N
FUERZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA				
Hidrólisis almidón	+		+	+
" celulosa	-		-	-
" gelatina	-		-	-
Lече caseolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas		Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reacción nitratos	-		-	-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cepa. <u>Mizodus oligosporus.</u>				
Fecha de siembra. 6/Febrero/1980		Fecha de cosecha. 22/Febrero/1980		
VIABILIDAD				
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	24 meses
Suspensión de esporas	E	E	E	E
Dilución 10⁻²	E	E	E	E
" 10 ⁻⁴	E	E	E	MB
" 10 ⁻⁶	E	E	E	B
" 10 ⁻⁸	E	E	E	R
" 10 ⁻¹⁰	E	E	E	P
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUIMICA				
Hidrólisis almidón	+			+
" celulosa	-			-
" gelatina	-			-
Leche tornasolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-

DATOS DE CONSERVACION.

Nombre de la cema. <u>Rhizopus sp.</u>					
Fecha de siembra. 15/Noviembre/1979			Fecha de cosecha. 5/Diciembre/1979		
VIABILIDAD					
	Al envasar	1 mes	después de 2 meses	5 meses	27 meses
Suspensión de esporas	+	+	+	+	+
Dilución 10 ⁻²	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁶	+	+	+	+	+
" 10 ⁻⁸	+	+	+	+	+
" 10 ⁻¹⁰	+	+	+	+	+
PUREZA	Satisfactoria	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	Satisfactorias	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
BIOQUÍMICA					
Hidrólisis almidón	+			+	+
" celulosa	-			-	-
" gelatina	-			-	-
Leche termozolada	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas			Alcalinidad Coagulación Prod. de gas	Alcalinidad Coagulación Prod. de gas
Reducción nitratos	-			-	-

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1. El método de conservación de hongos en solución salina estéril mantiene inalterables tanto las características morfológicas macro y microscópicas como las características bioquímicas de todos los hongos estudiados, después de dos años de almacenamiento.
2. Este es un método excelente para conservar los hongos hasta por períodos de seis meses, sin pérdida de la viabilidad.
3. Para las cepas del género Aspergillus, este método mantiene la viabilidad original hasta por más de dos años, por lo que se considera un método ideal.
4. En las cepas de los géneros: Alternaria, Geotrichum, Helminthosporium, Penicillium y Rhizopus existe disminución de la viabilidad después de un período de almacenamiento de dos años, pero esta disminución no se manifiesta en las suspensiones originales, sino a partir de la dilución 10^{-2} , por lo cual el método puede considerarse aplicable, aunque no ideal.
5. La desecación de las esporas contenidas en los viales ocasiona pérdida de la esporulación en las cepas de los géneros: Penicillium sp. (productor de antibiótico, cepa #13), Penicillium sp. (productor de antibiótico, cepa #16) y Paecilomyces sp. obteniéndose únicamente micelio estéril. Esto hace indispensable la revisión periódica de los viales almacenados para reponer el agua evaporada.
6. Considerando que la laboriosidad del método es comparable a la requerida para el proceso de liofilización se recomienda que, cuando se cuente con el equipo y personal adecuados, se liofilicen los hongos, ya que este último método permite conservar las cepas por

tiempos más prolongados, sin necesidad de agregar agua a los viajes para evitar la desecación de éstos. lo cual representa trabajo y riesgo de contaminación.

6. BIBLIOGRAFIA.

1. Benedek T. 1962. On Castellani's "water cultures" and Benedek's "mycotheca" in chlorallactophenol. *Mycopathol. Mycol. Appl.* - 17 (3): 255-260.
2. Bakerspigel A. 1953. Soil as storage medium for fungi. *Mycologia* 45: 596-604.
3. Bosmans J. 1974. Ten years lyophilization of pathogenic fungi. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 3: 13-23.
4. W. Battersfield, S.C. Jong, and H.T. Alexander. 1974. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. *Can. J. Microbiol.* 20: 1665-1673.
5. Castellani A. 1961. Long term observations on pathogenic fungi in culture. *J. Trop. Med. Hyg.* 64 (3): 60-63.
6. Castellani A. 1964. The water cultivation of pathogenic fungi. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 44 (2): 217-220.
7. Castellani A. 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Trop. Med. Hyg.* 70 (8): 181-184.
8. Lewis H.J. 1967. Viability and behavior of lyophilized cultures after storage for twenty-one years. *J. Bact.* 85: 486-487.
9. Bechtler, G.F. and A.P. Hinfret. 1967. Survival of microorganisms after ultra rapid freezing and thawing. *J. Bact.* 85: 485.
10. Donald H. Marx and William J. Daniel. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can. J. Microbiol.* 22 (3): 338-341.

11. Fennel. D.I. 1960. Conservation of fungus cultures. Bot. - Rev. 26: 79-141.
12. Goos, R.D., E.E. Davis and W. Butterfield. 1967. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. Mycologia 59: 58-66.
13. Shuh Wei Hseng. 1960. Effect of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. Mycologia 52: 527-529.
14. N. E. Hoggins, A. A. Padhye, and L. Ajello. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic Actinomyces in sterile distilled water. Appl. -- Microbiol. 28 (2): 218-222.
15. E. S. Bueche, and A. L. Rogers. 1970. Medical Mycology Manual. Tercera edición. Burgess Publishing Company.
16. M. Ulloa y R. Hanlin. 1978. Atlas de Micología básica. Primera edición. Editorial Concepto, S. A.
17. H. M. Conant, D. T. Smith, R. D. Baker y J. L. Callaway. - 1972. Micología. Tercera edición. Editorial Interamericana.
18. TESIS. 1981. González Flores Martha. Investigaciones sobre nuevos antibióticos de Penicillium.
19. W. B. Bailey and E. G. Scott. 1974. Diagnostic Microbiology. Cuarta edición. The C. V. Mosby Company.
20. H.J. Pelczar y R. D. Reid. 1979. Microbiología. Segunda edición. Libros McGraw-Hill.
21. Valasco Castrejón G. y Tav Zavala J. 1978. Nociones de Micología. Primera edición. Francisco Múñez Cervantes, editor.

22. G. Segretain, E. Drouhet y F. Mariat. 1977. Diagnóstico de laboratorio en micología médica. Primera edición. La Prensa Médica Mexicana.