



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

“Conformación de un cepario de *Aspergillus niger* e  
implementación de dos métodos de conservación  
a mediano plazo”

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
***Químico Farmacéutico Biólogo***

**P R E S E N T A**

Bernal Amador María Isabel

DIRECTOR

Mtra. Dora A. Pérez González

ASESOR

Q.F.B. Patricia Vidal Millán



**Octubre 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## \*\*DEDICATORIAS\*\*

Mis padres Ernesto Bernal y Guadalupe Amador por todas sus enseñanzas y consejos que me han dado, gracias por su confianza y apoyo incondicional.

A Cilli por su amor y paciencia.

A Donovan por su cariño y apoyo.

A mis hermanos, familiares y amigos, *que de alguna forma u otra estuvieron conmigo* apoyarme incondicionalmente.

## \* \*AGRADECIMIENTOS \* \*

A la Mtra. Dora Alicia Pérez González por su asesoramiento y sugerencias durante el trabajo y redacción de la tesis, por su amistad y estímulo para seguir adelante.

A la Q.F.B. Patricia Vidal Millán por su disposición permanente, valiosa e incondicional en aclarar mis dudas así como en sus acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

*“Conformación de un cepario de A. niger e implementación de dos métodos de conservación”*

---

A mis sinodales: I. B. I. Susana Méndez Vázquez, M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, Q. F. B. Beatriz Arellano Pimentel, por su paciencia y dedicación en revisar este trabajo.

A cada uno de los profesores que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Marco Teórico	3
A. Generalidades de los hongos	3
1. Los hongos (Fungi = Mycota)	3
B. Aislamiento de hongos	3
1. Métodos de muestreo y obtención de la muestra	3
2. Identificación de los hongos	4
a) Morfología macroscópica	4
b) Morfología microscópica	4
c) Preparado por disgregación	5
d) Preparados con cinta adhesiva transparente	5
e) Análisis a través del tubo de ensaye	5
f) Microcultivo	5
C. <i>Aspergillus</i>	6
1. Morfología	6
2. Cultivos	8
3. Ambiente	9
4. Cultivos puros	10
D. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial	10
1. Selección	10

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

a) Aislamiento directo	
12	
b) Enriquecimiento del cultivo	
12	
2. Mantenimiento o conservación de los cultivos	
13	
a) Conservación	13
b) Subcultivos	
14	
c) Mantenimiento bajo capa de aceite	15
d) Congelación	
15	
e) Cultivos en tierra	
16	
f) Preservación en celulosa	
17	
g) Liofilización	
17	
h) Agua estéril	
18	
3. Los agentes crioprotectores	
19	
a) Agentes penetrantes	23
b) Agentes no penetrantes	
23	
4. Problemas de pérdida y degeneración de cepas	
24	
a) Contaminación por otros microorganismos	
24	
b) Infestación por ácaros	
24	
c) Infestaciones por fagos.	
25	
d) Mutación	
25	
e) Manejo por personal inexperto	
26	
5. Colecciones de cultivos	26

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

6. Material de referencia certificado	
27	
7. Cepas de referencia certificadas	
27	
8. Medios de cultivo	28
9. Control de calidad de pureza y viabilidad	
28	
a) Frecuencia de realización de este control	
28	
b) Registro de Control de calidad de pureza y viabilidad de las cepas	28
c) Pruebas a realizar	28
d) Almacenamiento de las cepas	
29	
II. Planteamiento del problema	
30	
III. Objetivos	
31	
A. Objetivo general	31
1. Objetivos particulares	
31	
IV. Hipótesis	
32	
V. Diseño experimental	
33	
1. Diagrama de flujo	
	33
VI. Método	34
A. Materiales y métodos	34
1. Material	34
a) Material biológico	35
b) Equipos	34
c) Medios de cultivo	
34	
d) Reactivos	
34	
e) Antibióticos	34
f) Colorantes	
35	
2. Métodos	35

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

a) Resiembra		
35		
b) Preparación del soporte (leche descremada)		
36		
c) Suspensión celular		36
d) Microcultivo		37
e) Tinciones		
38		
(1) Tinción con azul de algodón acético		
38		
(2) Tinción con eritrosina		38
f) Conteo de esporas		38
g) Viabilidad del hongo		39
(1) Recuento de hongos		
39		
h) Conservación en capa de aceite		
40		
VII. Resultados		41
VIII. Análisis de resultados	51	
IX. Conclusiones		53
X. REFERENCIAS		54
ANEXO		
55		

## Resumen

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza dentro de la carrera de Q. F. B. en el noveno semestre de la orientación Farmacia Industrial se imparte el módulo de Microbiología Farmacéutica y en la práctica “Aislamiento de microorganismos productores de ácidos orgánicos” se han logrado aislar 23 cepas de *A. niger* a partir de diferentes fuentes naturales y se cuenta además con una cepa de referencia de la colección ATCC, mismas que se han conservado durante 17 años por resiembra periódica en agar inclinado el cual es un método a corto plazo; para evitar la pérdida y degeneración de estos cultivos se planteó la conformación de un cepario utilizando los métodos de congelación a -40 °C y conservación cubriendo completamente el cultivo en medio sólido inclinado con una capa de aceite mineral, para comprobar la eficacia de los métodos y poder determinar que las cepas fúngicas son viables, puras y estables, se evaluó cada mes estas características, tomando un inóculo y realizando una serie de diluciones hasta llegar a 1:40000, posteriormente de la última dilución se realizó una resiembra en placa así como el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, esto se realizó para cada cepa así como para cada método durante el periodo de mantenimiento que abarcó de noviembre de 2009 a mayo de 2010, esperando que no presentaran cambios significativos en sus estructuras y viabilidad, garantizando la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, obteniendo datos satisfactorios en el método de congelación, por lo contrario con el de capa de aceite mineral donde algunas cepas no se recuperaron por completo; lo que hace concluir que de los dos métodos empleados el mejor es el de congelación.

Se conformó el cepario de las 24 cepas utilizadas en el estudio y se documentó su fuente, fecha y responsable de aislamiento, medio de cultivo de conservación a corto plazo. Así mismo se mantendrán a mediano plazo en congelación por triplicado en el laboratorio de producción.

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas licorales), fabricación de solventes y reactivos; se usan como material de referencia, necesario para asegurar la calidad de los procedimientos utilizados por laboratorios en la identificación de patógenos, controles de susceptibilidad a los antibióticos, orientar los estudios comparativos a nivel epidemiológico, en estudios moleculares, entre otras. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

Existen colecciones pequeñas en países en desarrollo que pueden ser muy especializadas y mantener organismos únicos o interesantes de distribución limitada, sin embargo, tanto las colecciones más estructuradas como las que se encuentran en desarrollo han generado una gran cantidad de datos, creando una creciente demanda de antecedentes históricos en relación al aislamiento, selección, taxonomía, fisiología, genética, conservación e información relacionada con las actividades de la colección, administración, manejo de datos, preparación de catálogos, cursos, etc.

La conservación de cepas microbianas debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos. El conocimiento de las técnicas de conservación existentes para su correcta aplicación, así como el seguimiento continuo de propiedades de las cepas, propician su empleo como inóculo confiable en la industria, la docencia y la investigación.

Las colecciones de cultivos, en la actualidad, para su conservación emplean la liofilización y la crioconservación, cuando se cuenta con los recursos necesarios, de lo contrario se emplean alternativas menos costosas, en el método de conservación por congelación a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el que las células son suspendidas en un medio líquido que contiene un agente crioprotector (leche desnatada) las células detienen su crecimiento, disminuyendo su tasa metabólica, la conservación cubriendo completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido con una capa de aceite mineral, los cultivos en esta forma se

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

pueden conservar a temperatura ambiente o refrigeración; esto con el fin de mantener las cepas, puras estables y viables garantizando la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, además que presenten menor costo para su utilización.

## **I. Marco Teórico**

### **A. Generalidades de los hongos**

#### **1. Los hongos (Fungi = Mycota)**

Los hongos son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza, son de estructura eucariótica, incapaces de realizar la fotosíntesis (carecen de clorofila) o la quimiosíntesis; para producir sus elementos estructurales dependen de fuentes externas de carbono orgánico (son heterótrofos). Pueden vivir sobre materia muerta (saprófitos) o como parásitos de otros organismos: vegetales, animales y el hombre. Se pueden cultivar con facilidad en medios de cultivos artificiales ya que sus requerimientos nutritivos son extraordinariamente simples.

Pueden ser uni o multinucleados; el conjunto de las hifas forman un micelio, puede ser homo o heterotálico, dicariótico y rara vez diploide. La pared celular está constituida principalmente por polisacáridos del tipo de la quitina; también se encuentran mananas, glucanas y celulosa; el principal componente lipídico es el ergosterol.

La mayoría son aerobios y la reproducción puede ser de tipo sexual o asexual. Los hongos unicelulares están representados por las levaduras y los multicelulares por los hongos filamentosos.<sup>1, 2 3</sup>

### **B. Aislamiento de hongos**

#### **1. Métodos de muestreo y obtención de la muestra**

Los hongos son organismos que ocupan casi todas partes como nicho ecológico. Antes de iniciar un programa de aislamiento, es importante definir sus objetivos (producto de interés) y para comprender la estructura del ecosistema donde se toman las muestras, esto ayudará a determinar los tipos de medioambientes y el aislamiento de la muestra; éstas deben recolectarse mediante el uso de guantes estériles, pinzas, bisturí, o cucharas, asépticamente en recipientes como bolsas o botellas, utilizarse inmediatamente o almacenarlas de la noche a la mañana a 5

°C. Cuando se recolectan muestras de suelo, todos los horizontes de un suelo, deben ser incluidos como la hojarasca, detritos, rizosfera, arena, grava y rocas.

Las muestras de agua pueden ser colectadas de estuarios, alcantarillas, lagos, entornos marinos, arroyos, etc. Por lo menos 50 mL de agua deben recolectarse en botellas estériles.<sup>4</sup>

## **2. Identificación de los hongos**

Al obtener el cultivo de un hongo se deben estudiar sus características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas para definir el género y la especie.<sup>5</sup>

En general, la morfología de cualquier colonia depende del tipo de medio donde se desarrolle, la temperatura, grado de humedad, oxigenación, pH, presencia y cantidad de ciertos sustratos como los azúcares.<sup>2</sup>

### **a) Morfología macroscópica**

La morfología macroscópica de sus colonias corresponde al aspecto de éstas. Se deben estudiar las siguientes características: <sup>5</sup>

1. Forma y tamaño.
2. Color en la superficie y en el reverso (blanca, rosada, gris, anaranjada, verde, rojiza, negra).
3. Difusión del pigmento.
4. Textura: terrosa, granulosa, vellosa, lanosa, cérea, cremosa.
5. Superficie: elevada o plana, levantamiento central.
6. Aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme.
7. Consistencia: dura, suave, firme, membranosa.
8. Rapidez de crecimiento.

### **b) Morfología microscópica**

Es un estudio necesario que se hace a la hora de llevar a cabo una identificación fúngica<sup>6</sup>

### **c) Preparado por disgregación**

Mediante el uso de dos agujas de disección o dos palillos aguzados se extrae una pequeña porción de la colonia a examinar incluido parte del agar que se encuentra debajo de la superficie. Se coloca el fragmento de la colonia con las agujas de disección y se cubre con un cubreobjetos.

La dispersión puede facilitarse si se presiona con suavidad la superficie del cubreobjetos con el cabo de un lápiz, en particular si hay pequeños grumos de agar.

La disgregación de la colonia con frecuencia rompe las delicadas estructuras de fructificación de los hongos filamentosos, lo que en algunos casos dificulta la observación de las disposiciones de las esporas, necesarias para la identificación definitiva.<sup>7</sup>

### **d) Preparados con cinta adhesiva transparente**

Este método suele ser útil debido a que la disposición de las esporas de los hongos filamentosos se conservan mejor. El lado engomado de la cinta de celofán se coloca de manera suave pero firme sobre la superficie de la colonia levantando una porción del micelio aéreo. El preparado se hace mediante la colocación de una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos. Se adhiere una punta de la cinta adhesiva a la superficie del portaobjeto al lado de la gota y luego se estira la cinta sobre la gota de colorante para hacerla descender con suavidad, de manera que el micelio se impregne con el colorante. La cinta se estira bien y se pega el extremo opuesto al vidrio, evitando en lo posible atrapar burbujas de aire.<sup>7</sup>

### **e) Análisis a través del tubo de ensaye**

Se utiliza la lupa del microscopio, observándose el borde de crecimiento. Es un método poco preciso pero rápido.<sup>5</sup>

### **f) Microcultivo**

Esta técnica se utiliza en micología para el estudio de ciertas estructuras de los hongos que son muy frágiles y se deterioran fácilmente, al ser obtenidas para su observación a partir de un macrocultivo, es una técnica eficaz para identificar y clasificar los hongos filamentosos. Es un cultivo en portaobjetos el cual permite la observación de las estructuras fúngicas microscópicas que se distinguen con facilidad sin distorsión, alteración o rompimiento de las mismas, esto pasa cuando el hongo se desarrolla directamente debajo del cubreobjetos, pueden observarse un gran número de áreas representativas. Permite confirmar la sospecha de hongo filamentosos basada en la estructura micelial y fructífera.<sup>7,8</sup>

### **C. *Aspergillus***

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión sus conidios pueden permanecer suspendidos en el ambiente durante un largo periodo de tiempo por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación.

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios, los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones.

#### **1. Morfología**

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Fig. 1) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato.<sup>9</sup>

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

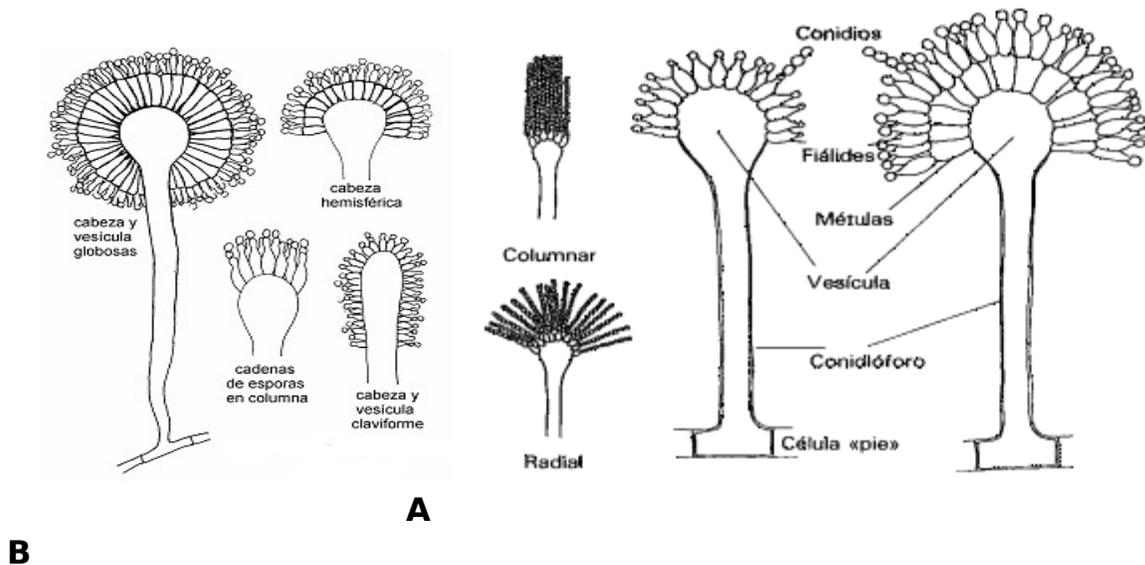


Figura 1. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*  
A: cabezas conidiales y B: conidióforos.

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.<sup>9</sup>

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agruparlos en secciones o grupos como se indica la tabla 1.

**Tabla 1.** Características de los grupos/secciones de *Aspergillus* (Klich & Pitt 1992, Kozakiewicz 1989).

Sección	Grupo	Conidios	Métula	Vesícula	Conidióforo
<b><i>Aspergilli</i></b>	<i>A. glaucus</i>	Verde, rugoso	No	Globosa a espatulada	Liso
<b><i>Candidi</i></b>	<i>A. candidus</i>	Blanco	Si	Globosa	Liso
<b><i>Cervini</i></b>	<i>A. cervinus</i>	Anaranjado	No	Globosa	Liso
<b><i>Circumdati</i></b>	<i>A. ochraceus</i>	Amarillo	Si	Globosa	Liso o rugoso
<b><i>Clavati</i></b>	<i>A. clavatus</i>	Verde claro	No	Claviforme	Liso
<b><i>Cremei</i></b>	<i>A. cremeoflavus</i>	Verde pardo	Si/no	Globosa	Liso
<b><i>Flavipedes</i></b>	<i>A. flavipes</i>	Canela	Si	Espatulada	Liso
<b><i>Flavi</i></b>	<i>A. flavus</i>	Verde pardo	Si/no	Globosa	Rugoso
<b><i>Fumigati</i></b>	<i>A. fumigatus</i>	Verde azulado	No	Espatulada	Liso

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

Continuación de la tabla 1

<b>Nidulantes</b>	<i>A. nidulans</i>	Verde oscuro	Si	Espatulada	Liso
<b>Nigri</b>	<i>A. niger</i>	Negro	Si/no	Globosa	Liso
<b>Ornati</b>	<i>A. ornatulus</i>	Aceituna, verde amarillento	No	Espatulada	Liso
<b>Restricti</b>	<i>A. restrictus</i>	Verde oscuro forma de tonel	No	Piriforme	Liso
<b>Sparsi</b>	<i>A. sparsus</i>	Aceituna pardo	Si	Globosa a piriforme	Rugoso
<b>Terrei</b>	<i>A. terreus</i>	Canela pardo	Si	Globosa	Liso
<b>Usti</b>	<i>A. ustus</i>	Gris aceituna	Si	Oval	Liso
<b>Versicolores</b>	<i>A. versicolor</i>	Verde	Si	Variable	Liso
<b>Wentii</b>	<i>A. wentii</i>	Beige	Si	Variable	Liso a rugoso

Tomado de: Carrillo L, 2003.

## 2. Cultivos

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura pero los aspergilos osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre Czapek-20% Sacarosa. La temperatura de incubación es de 25 °C pero, para algunos miembros de la sección *Fumigati* es conveniente 37 °C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras.

Para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos mohos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia aunque restringida, si el número no es demasiado grande. Si solamente interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* se suele sembrar sobre el medio AFAP que es selectivo para dichas especies. Con el fin de identificar los aspergilos se suele sembrar en placas de Malta-Glucosa, Czapek-Levadura, Czapek-Glicerol o Czapek-20% Sacarosa incubando a 5, 25 y 37 °C registrando las características macro y micromorfológicas.

Para comprobar que los medios utilizados son adecuados y poder observar la velocidad de crecimiento así como las características macro

y microscópicas del microorganismo, es conveniente sembrar cepas obtenidas de una colección de referencia. La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se los mantiene durante mucho tiempo mediante sucesivas picaduras.<sup>9</sup>

### 3. Ambiente

La ubicuidad de los *Aspergillus* es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad.

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 5 °C a 65 °C dependiendo de la especie, en la tabla 2 se muestran algunos rangos de temperatura para algunas especies de *Aspergillus*.

Tabla 2. Rangos de temperatura para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus*.

Especies	Temperatura (°C)	
	Rango	Óptima
<i>A. restrictus</i>	9-40	25-30
<i>A. clavatus</i>	5-42	25
<i>A. fumigatus</i>	12-65	37-45
<i>A. flavipes</i>	6-40	26-28
<i>A. terreus</i>	11-48	35-40
<i>A. versicolor</i>	4-40	21-0
<i>A. flavus</i>	6-45	25-37
<i>A. niger</i>	9-60	17-42

Tomada de: Smith J. E., 1994.<sup>34</sup>

En la tabla 3 se describe el color de la superficie y reverso de las colonias de *A. niger*.

**Tabla 3.** El color de la colonia en diversas especies de *Aspergillus*.

<b>Especies</b>	<b>Superficie</b>	<b>Reverso</b>
<i>A. clavatus</i>	Azul-verde	Blanco, marrón con la edad
<i>A. flavus</i>	Amarillo-verde	Dorado a rojo pardo
<i>A. fumigatus</i>	Azul-verde al gris	Blanco
<i>A. glaucus</i>	Zonas de color amarillo con verde	Amarillento a marrón
<i>A. nidulans</i>	Verde, al amarillo ocre	Aceite de oliva a rojo púrpura
<i>A. niger</i>	Negro	Blanco a amarillo
<i>A. terreus</i>	Canela a café	Blanco a marrón
<i>A. versicolor</i>	Blanco, al principio, se convierte a amarillo, tostado, verde o rosa pálido	Blanco a amarillo o rojo púrpura

Tomada de: [Microbiología General I, FES Zaragoza, UNAM, microbiologia1.blogspot.com](http://microbiologia1.blogspot.com).<sup>10</sup>

#### **4. Cultivos puros**

Un cultivo puro de mohos se obtiene por picadura de un pequeño manojito de hifas o grumo de esporas en varios puntos de la placa de medio selectivo. En algunos casos esta técnica no es satisfactoria y entonces conviene hacer una dispersión de las esporas sobre la superficie de agar estéril. Si son suficientemente grandes con una aguja de disección o asa recta se toma el trozo de agar que contiene la espора y se transfiere al medio de cultivo.<sup>11</sup>

### **D. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial**

#### **1. Selección**

Debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, en la elección del mismo se deben tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación:

1. La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
2. Su velocidad de crecimiento deberá ser alta.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

3. La cepa debe estar libre de contaminantes, incluidos fagos.
4. Sus requerimientos nutricionales deberán ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
5. Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
6. Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.
7. Si el objetivo del proceso es un producto, éste debería ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.<sup>12, 13, 14,15</sup>

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas. En algunos casos se dispone de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios.

Existen en el mundo un gran número de colecciones depositarias de cultivos. Entre la diversidad de colecciones se destacan: "American Type Culture Collection"(ATCC), USA, la cual mantiene bacterias, levaduras, algas, actinomicetes, mohos, protozoos, virus y líneas celulares; "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes"(CNCM) del Instituto Pasteur, Francia; "Northern Regional Research Laboratory "(NRRL), de Peoria, USA, y "National Collection of Type Cultures"(NCTC), Londres, Inglaterra.

Si el organismo a utilizar es aislado de fuentes naturales como agua, suelo, plantas y desechos, la elección del material de partida puede hacerse teniendo en cuenta que el organismo exprese en ese ambiente las propiedades que son de interés. Por ejemplo, en suelos tratados con pesticidas se podrían encontrar organismos adaptados a la degradación de estos productos químicos; o en larvas de insectos muertos agentes causales de la muerte.<sup>12, 13, 14,15</sup>

Elegida la fuente de aislamiento, las posibilidades de éxito dependen de la técnica elegida para el mismo; en este caso las alternativas son: a)

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

aislamiento directo, o b) enriquecimiento del cultivo con o sin pretratamiento de la muestra.

Una vez efectuado el muestreo y selección (screening) para el aislamiento de una cepa de interés, la misma deberá ser caracterizada. En este procedimiento se debe tener en cuenta que la composición química del material a partir del cual se va a realizar el aislamiento comienza a variar a partir del momento en que es tomada la muestra, por lo tanto ésta se debe procesar rápidamente, tratando de evitar alteraciones que afecten a la población de interés.

**a) Aislamiento directo:** en este caso es deseable que el medio que se utiliza para el aislamiento permita la máxima expresión del material genético del organismo. Si se busca por ejemplo un organismo con acción antimicrobiana, se puede crecer al potencial productor, en una caja de petri en presencia del o los organismos contra los cuales se requiere la acción antimicrobiana, observándose la producción del inhibidor por las zonas de inhibición de crecimiento.

Para la detección de productores de factores de crecimiento tales como aminoácidos y nucleótidos se utiliza la estimulación del desarrollo de bacterias auxótrofas por un lisado del organismo. Esto se puede llevar a cabo en medios sólidos.

En este caso se debe tener una "réplica" de la caja a ensayar. Una vez obtenido el crecimiento en la primera caja, se replica a una segunda, antes de "matar" las colonias con luz. U.V., por ejemplo. Esta caja es luego cargada con agar conteniendo una suspensión del organismo auxótrofo al producto buscado. Después de un período de incubación se observa crecimiento en forma de halo alrededor de las colonias productoras, lo que permite el aislamiento de este organismo de la placa réplica.

**b) Enriquecimiento del cultivo:** esta técnica consiste en incrementar en una población mixta el número de organismos de interés en relación al resto. De esta forma se busca favorecer el crecimiento de un tipo dado de microorganismos mediante condiciones de cultivo adecuadas al mismo, o de condiciones inapropiadas para el desarrollo de los otros. Esto se logra mediante el empleo de sustratos específicos o ciertos inhibidores. Para mantener la fuerza selectiva del medio, el cual

se modifica por el crecimiento del organismo buscado, se realizan subcultivos periódicos en medio fresco. Esto lleva a que el organismo de interés sea el dominante de la población, lo cual facilita su posterior aislamiento en medio sólido.<sup>12, 13, 14,15</sup>

## **2. Mantenimiento o conservación de los cultivos**

### **a) Conservación**

La conservación de los cultivos es un problema común a numerosos campos de la Microbiología. Su función esencial es conservar la viabilidad del microorganismo evitando cualquier contaminación, variación, mutación, deterioro, es decir, asegurando la estabilidad de las propiedades funcionales y la integridad del genoma.

Ciertos métodos de conservación pueden, en efecto, provocar alteraciones genéticas que se traducen en modificaciones fenotípicas.<sup>13</sup>

Los objetivos de la conservación de los cultivos se resumen en los siguientes aspectos:

1. Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
2. Preservar los niveles de su productividad inicial.
3. Lograr que el cultivo pueda transportarse y manejarse con facilidad.

Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de conservación, en todo trabajo de Microbiología se deben conocer las características de la población con la cual se va a trabajar (propiedades morfológicas y bioquímicas).

En este sentido, tanto en la conservación como en el desarrollo del cultivo, ya sea el que suministra o el que recibe la cepa, deberían usar

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

las mismas técnicas metodológicas. Tanto para el mantenimiento, preparación y propagación de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no produzcan variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada.

El conocimiento de las características del cultivo es esencial en la elección de un método de preservación. La identidad del cultivo puede conocerse con base a sus características de crecimiento en uno o más medios específicos, tomando en consideración propiedades macro y microscópicas exhibidas, o con base a una evaluación más exhaustiva empleando muchos ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos.<sup>15, 16, 17, 18, 19</sup>

En general los cultivos no son estudiados en detalle debido a la casi imposibilidad de determinar en cada etapa si ha ocurrido o no alteración genética. En la mayoría de las situaciones solamente se pueden notar cambios mensurables u observables tales como pigmentación, morfología, reacciones fermentativas, propiedades microscópicas, etc. El análisis de estos parámetros junto con la determinación cuantitativa del recuento de colonias antes y después del proceso de mantenimiento brinda la información necesaria para la correcta evaluación de la técnica de conservación a elegir.<sup>15, 16, 17, 18, 19</sup>

Tabla 4. Comparación de algunos métodos de conservación

<b>Costo</b>				
<b>Metodos de conservación</b>	Material	Trabajo	Longevidad	Estabilidad genética
<b>Transferencia en agar</b>				
Almacenamiento a temperatura ambiente	Bajo	Alto	1 - 6 meses	Variable
En refrigeración	Medio <sup>a</sup>	Alto	6 - 12 meses	Variable
En aceite	Bajo	Bajo / Medio	1 - 40 años	Pobre
En agua	Bajo	Bajo / Medio	2 - 5 años	Moderado
En el congelador	Medio <sup>a</sup>	Bajo / Medio	4 - 5 años	Moderado
<b>Secado</b>				
En suelo	Bajo	Medio	5 - 25 años	Moderado a
Silica gel	Bajo	Medio	5 - 19 años	bajo bueno
Liofilización	Alto	Insignificante <sup>b</sup>	4 - 40 años	Bueno medio
<b>Congelación</b>				
Nitrogeno líquido	Alto	Bajo	Infinito	Bueno, 23 años hasta la fecha

a. Refrigerador o costos de congelación incluidos.

## “Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

b. procesamiento inicial es costoso en función del método, el mantenimiento es insignificante.  
Tomada de: Hunter CJ, Belt. 1996

Los métodos de preservación o mantenimiento más importantes son los siguientes:

### **b) Subcultivos**

Es un método común de conservación, que consiste en la resiembra periódica del cultivo en un medio nutritivo fresco. El intervalo de transferencia varía con el microorganismo, debiendo considerarse el medio adecuado para cada especie. Una vez desarrollados los cultivos se mantienen a 4 °C durante lapsos que oscilan entre 15 días y 8 meses dependiendo del microorganismo.

Los inconvenientes que presenta son:

1. Incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismo.
2. Riesgo de contaminación.
3. Alteraciones en el medio de cultivo, durante la estadía en frío, en la cual se produce una desecación gradual del mismo.

### **c) Mantenimiento bajo capa de aceite**

Es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos microorganismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral o vaselina estéril. Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en refrigeración por períodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de mutación; sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento.

### **d) Congelación**

Debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura, la

## “Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos períodos de tiempo. A esto ha contribuido también la mayor disponibilidad de nitrógeno líquido (-196 °C) y el mejoramiento de los equipos de refrigeración.

También es aconsejable utilizar una densidad celular elevada en la congelación, debido a que, cuando parte de las células se lisan se liberarían sustancias crioprotectoras que aumentarían el porcentaje de células sobrevivientes.

Las células a congelar pueden ser resuspendidas directamente en un agente crioprotector o se puede agregar el mismo como aditivo al medio de cultivo. El más empleado es glicerol al 10%, aunque otros agentes como dimetilsulfóxido, glucosa, dextranos, sacarosa, suero de conejo, lactosa y extracto de malta, han sido también empleados.

La suspensión celular es colocada en ampollas (vidrio o plástico) y sellada antes de colocarla bajo nitrógeno líquido. Uno de los problemas de esta técnica se refiere a la velocidad de congelación.

Muchos estudios son coincidentes en señalar que una velocidad de congelación lenta y una rápida descongelación rinden los mayores números de células viables. Se encontró que dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso para obtener una máxima sobrevivencia.

Como criterio general se puede decir que, lo más ampliamente usado es el enfriamiento a -1 °C/min (ya que una rápida congelación causa ruptura de membranas) hasta -20 °C y luego un rápido descenso.

En cuanto a la temperatura de conservación, la más baja recomendada es -70 °C, ya que a temperaturas más altas ocurren algunas recristalizaciones, las cuales si son intracelulares son letales para las células.

En caso de nitrógeno líquido, la conservación podría prolongarse por años, asegurando una buena provisión del mismo y disponiendo de equipos con sistemas de alarma en caso de fluctuaciones de temperatura.

Para recuperar el cultivo congelado, las muestras se descongelan rápidamente por inmersión en un baño de agua a 37 °C por algunos segundos (1 minuto aproximadamente). Antes de abrir los criotubos se

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

deben secar y limpiar con un bactericida, por ejemplo cloruro de benzalconio.

### **e) Cultivos en tierra**

La tierra estéril puede ser inoculada con un cultivo e incubada varios días para inducir esporulación de bacilos aerobios y anaerobios. Una vez que la misma se manifiesta, la tierra es secada (deseCADOR) y el cultivo mantenido de esta forma en una atmósfera seca o en refrigerador. El método ha sido utilizado ampliamente con hongos y actinomicetos, los cuales han sido mantenidos en estas condiciones varios años. También se puede utilizar tierra para la conservación directa de suspensiones de esporas.

### **f) Preservación en celulosa**

El empleo de un soporte de papel para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas. La técnica consiste en embeber tiras de papel de filtro con una suspensión densa de organismos en suero, glutamato de sodio u otro agente, las mismas son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado bajo vacío. De esta forma se han logrado conservar cepas de *Streptomyces* y *Salmonella* por períodos de hasta 2 años a temperatura ambiente.

### **g) Liofilización**

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se les liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas,

## “Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

actinomycetos y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio.

La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células con un medio crioprotector, en el cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual se congela a aproximadamente -40 °C y deshidratada mediante una sublimación en vacío. El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío.

El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%; suero equino, mezclas de suero, glucosa y extracto de levadura; suero fetal bovino, etc.

En algunos casos el efecto protector de la leche descremada se mejora por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea. La sacarosa se ha empleado para reemplazar la leche descremada, y para mejorar su rendimiento se le adiciona glutamato de sodio y bacto casitona u otro componente nitrogenado.

Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunos casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido.

En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta.

Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%.

En general no es posible determinar para cada grupo de organismos el método de conservación ideal, por lo que se trata de emplear el más adecuado. De todos, la liofilización es el más utilizado, aunque algunos organismos muestran altas tasas de mortandad. En este caso la alternativa es la congelación, a pesar de que las cepas mantenidas de esta forma son difíciles de transportar.<sup>12</sup>

### **h) Agua estéril**

Es un método alternativo muy usado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como en levaduras y algunas bacterias.

Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Para hongos filamentosos se puede poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida.

## **3. Los agentes crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias que pasan a través de la membrana celular y producen una protección intra y extracelular contra la congelación, favoreciendo la viabilidad del microorganismo, sin producir cambio alguno sobre ellos, debido a que cuando la temperatura de la suspensión celular está por debajo de 0 °C, el agua del líquido extracelular comienza a congelarse formando cristales de hielo que aumentan la concentración del soluto y el agua intracelular migra al exterior por diferencia en la presión osmótica. Al remover mucha agua del interior se produce daño en las células.

La congelación y descongelación constituye una técnica conocida para el rompimiento celular y es porque el agua es removida durante el congelamiento en forma de hielo, los electrolitos llegan a incrementar la concentración en el agua descongelada y esto llega a ser perjudicial. Esto ya que la concentración electrolítica fuera de las células llega a ser muy diferente a la de adentro, llevándolas a la presión osmótica alta. Es por esto que se agregan agentes crioprotectores durante el crecimiento

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

del microorganismo o antes de congelar. En la tabla 4 se observan algunos ejemplos de crioprotectores.

El tipo de protector depende mucho del microorganismo; sin embargo, hay algunos que parecen trabajar bien con muchas especies. Generalmente, los agentes protectores pueden clasificarse en dos categorías: cristales amorfos formados, y cristales de sales eutécticas.<sup>15, 16</sup>

La formación de un estado cristalino aumenta la viscosidad dentro y alrededor de la célula para mantener al mínimo la movilidad molecular. El cristal amorfo inerte también puede retener productos que son desechados por las células dentro de la estructura, esto significa que estos no salen para iniciar los cambios electroquímicos irreversibles en la membrana del plasma durante el almacenamiento.<sup>15, 16, 17, 18, 19</sup>

Tabla 5. Ejemplos de crioprotectores.

Alcoholes	Adonitol Etilenglicol: etanediol Glicerol Metanol Propileglicol: 1, 2-propanediol Sorbitol
Aminas	Acetamida Betaina Formamida Glutamina Lisina Taurina
Sales inorgánicas	Sulfato de amonio Sulfato de magnesio Acetato de sodio
Macromoléculas	Suero de albumina Glicopéptido anticongelante Dextran Fosfolípido de yema de huevo Polietilenglicol Polivinilpitrolidona
Azúcares	Glucosa

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

Lactosa  
Maltosa  
Sucrosa  
Trehalosa

Dimetilsulfóxido (DMSO) es uno de los más importantes crioprotectores, que no pertenece a ninguna de estas clases

Nota: El proceso de congelación debe estar acompañado siempre de un crioprotector para evitar el daño a las células.

Tomado de: Soriano R, 2008.

Tabla 6. Crioprotectores utilizados en congelación y secado por congelación: ventajas y desventajas.

<b>Crioprotector</b>	<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>organismos supervivientes</b>
Agar en polvo	Nitrógeno líquido	Buen soporte seco	Viabilidad baja	<i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora humili</i>

Tomada de: Hunter CJ, Belt. 1996

Continuación de la tabla 6

Dimetil sulfóxido ( DMSO 5% v / v)	Nitrógeno líquido	Proporciona alta viabilidad, penetra rápidamente en la célula	Tóxico para los microorganismos y para los seres humanos, no se puede liofilizar	Ascomycota (44 cepas), Entomophthorales (19 cepas), Deuteromycetes (33 cepas), Ascomycota (62 cepas), Deuteromycetes (239 cepas), <i>Coprinus cinereus</i> , <i>Basidiobolus</i> spp., <i>Aspergillus</i> (6 spp., (8 cepas)
------------------------------------	-------------------	---------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

DMSO (10% v / v)	Nitrógeno líquido	Proporciona alta viabilidad, penetra rápidamente célula	Tóxico para los microorganismos y para los seres humanos, no se puede liofilizar	<i>Sclerospora phillippinensis</i> , <i>Sclerospora sacchari</i> , <i>Neocallimastix patriciarum</i> levaduras (33 cepas), incluyendo <i>Cándida lipolytica</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces octosporus</i>
DMSO (15% v / v)	Nitrógeno líquido	Proporciona alta viabilidad, penetra rápidamente célula	Tóxico para los microorganismos y para los seres humanos, no se puede liofilizar	<i>Bremia lactucae</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Sclerospora sorghi</i> , <i>Peronospora tabacina</i>
DMSO (10% v / v) y glucosa (8% v / v)	Nitrógeno líquido	Baja toxicidad y mejor viabilidad que DMS solo	Toxico para algunos microorganismos	<i>Deuteromyctes</i> (9 cepas), <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Pythium sylvaticum</i> , <i>Pseudophaeolus boudonii</i>
Caldo de glucosa (7,5% p /v glucosa)	Liofilización	Buen medio universal para las bacterias	Puede formar una película, lo que impide el secado	Bacterias, los hongos sobreviven menos y mueren en el almacenamiento

Tomada de: Hunter CJ, Belt. 1996

Continuación de la tabla 6.

Glicerol (10% v / v)	Nitrógeno líquido	Ampliamente aplicable	Baja toxicidad	<i>Achyla spp.</i> , <i>Allomyces</i> , <i>Aphanomyces sp.</i> , <i>Ascomycota</i> (62 cepas), <i>Basidiobolus sp.</i> , <i>Deuteromyctes</i> (239 cepas), <i>Coprinus cinereus</i> , <i>Deuteromyctes</i> (33 cepas),
----------------------	-------------------	-----------------------	----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

				<i>Entomophthorales</i> (19 cepas) <i>Hyphochytrium catenoides</i> , (micelio estéril); > 2000 cepas de 635 géneros de hongos, incluyendo especies de <i>Pythium</i> ., <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Phytophthora spp.</i> (3 cepas)
Glicerol (10% v / v) y leche desnatada (8,5 % p / v)	Nitrógeno líquido	Mejora de la viabilidad de algunos hongos que solo con glicerol	Baja toxicidad	
Inositol (7,5% p / v)	Liofilización	Un medio definido	Solo para algunas especies	Levaduras
Polivinilpirrolidona	Nitrógeno líquido	Reduce al mínimo contacto con el hielo	No penetrar en la célula; no proteger a los representantes de la Oomycota; difícil esterilizar a, y sensibles al calor viscoso	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Cercospora xanthosomatis</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Drechslera sp.</i> , <i>Emericellopsis terricola</i> , <i>Penicillium clavariiformis</i> , <i>blakesleeanus</i> <i>Phycomyces</i> , <i>Wallemia sebi</i>
Alcohol polivinílico	Nitrógeno líquido	Reduce el tamaño del cristal de hielo	Tóxico para algunas células Otro tipo	<i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora humuli</i>
La leche desnatada (10% p / v)	Liofilización	Fácil de preparar	No es un medio definido; no apto para esporas intrincadas o esporas con paredes delicadas	Esporas de hongos, incluyendo <i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Rhizopus</i> , y <i>Streptomyces</i>
Leche desnatada (10% p / v) e inositol (5% p / v)	Liofilización	La adición de inositol actúa amortiguador	-	Hongos > 11.000 cepas de 3500 especies de hongos

Tomada de: Hunter CJ, Belt. 1996

Los agentes crioprotectores modifican la tonicidad de las células haciendo posible que las velocidades de enfriamiento sean lentas, de esta manera se minimiza la congelación intracelular.

Los crioprotectores pertenecen a dos tipos principales, definidas por las bases de su permeabilidad a la célula.<sup>24, 25</sup>

**a) Agentes penetrantes.** Los cuales a concentraciones altas protegen las células contra el daño de una congelación lenta, causado por los cristales del hielo intracelulares y de los efectos osmóticos. Son de bajo peso molecular y generalmente son aplicados a altas concentraciones, entre estos se encuentra el DMSO, glicerol, etanol, metanol, acetato de amonio, tritilaminoacetato y etilenglicol.<sup>19</sup>

El mecanismo por el cual un agente protector penetra previniendo el daño celular es debido a sus propiedades coligativas de formar puentes de hidrógeno y esto indica la capacidad del agente protector para ligar o sustituir el agua. Los factores que se deben considerar para que un agente crioprotector sea conveniente son: baja toxicidad, alta solubilidad en agua y capacidad de enlace con ella, además de su facilidad de penetración en las membranas celulares.<sup>21, 22, 23</sup>

**b) Agentes no penetrantes.** Son utilizados a bajas concentraciones ya que pueden producir toxicidad a altas concentraciones y llegar a causar serios problemas, protegen a las células del daño provocado por los cristales de hielo extracelular, generalmente requieren de una mayor rapidez de enfriamiento, entre estos se encuentran los compuestos de macromoléculas como la polivinilpolividona, algunos azúcares como manitol, sorbitol y polímeros de almidón.<sup>21, 22, 23</sup>

El mecanismo por el cual otorga la protección no ha sido establecido, pero se ha propuesto uno a nivel extracelular en donde la presencia de estos agentes altera la permeabilidad de la membrana produciendo una salida irreversible de solutos que ocurre bajo la presencia de un cambio osmótico. El cambio hipertónico es disminuido durante el congelamiento por la entrada de solutos extracelulares y la lisis hipotónica es impedida durante el descongelamiento por la salida de solutos.<sup>21, 22, 23</sup>

Todas estas sustancias tienen una alta afinidad por el agua y son solubles incluso a bajas temperaturas, esto pueden relacionarse a sus efectos protectores. Los mecanismos propuestos en los efectos de la cristalización del agua son que disminuyen el punto de congelación, aumentando la permeabilidad de la membrana y la estabilización de la

estructura celular. Además de proteger a las células contra los daños causados por el agua intracelular, previenen la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular excesiva reduciendo la concentración intracelular de sales. Los criopreservantes no-permeables (polisacáridos, proteínas) son particularmente convenientes para los microorganismos, porque se adsorben en la superficie microbiana y forman una capa viscosa muy eficaz la cual protege a la pared celular y a la membrana microbiana.<sup>24</sup>

El rango de enfriamiento de la muestra juega un papel importante en la conservación celular después de la congelación, generalmente un rango de enfriamiento lento, en el orden de 5-10 °C/min, no permite la cristalización intracelular y los resultados en la viabilidad celular son altos después del almacenamiento.<sup>25</sup>

#### **4. Problemas de pérdida y degeneración de cepas**

##### **a) Contaminación por otros microorganismos**

Al momento de inocular muchos cultivos supuestamente puros nunca se logra obtener un segundo cultivo puro, esto ya que a menudo las colonias que crecen en la superficie del agar aparentan estar muy bien aisladas y puras, pero ocultan un segundo microorganismo que tiene un crecimiento escaso, tiende a propagarse en todo el cultivo llevando a la contaminación y pérdida de la cepa original.<sup>26</sup>

##### **b) infestación por ácaros**

Estos animales son extremadamente pequeños y pueden observarse raramente a simple vista. Ellos transportan esporas de hongos y parecen ser atraídos por el olor de ciertas especies de hongos. Aunque los tapones de algodón son una buena barrera a las esporas de los hongos, los ácaros cruzan el tapón de algodón de los cultivos puros. Si la infestación se extiende los cultivos son contaminados y pueden perderse, además muchos cultivos que aparentan estar puros pueden contener ácaros ocurriendo así una contaminación.

### **c) Infestaciones por fagos.**

Por lo común, se hacen distinciones entre virus relacionados con eucariontes y aquellos que infectan procariontes; estos últimos virus se denominan bacteriofagos.

Los virus son capaces de sobrevivir, pero no de proliferar, en ausencia de una célula huésped, para una propagación exitosa se requiere de una forma estable del virus que permita sobrevivir en ausencia de su huésped, unido a un mecanismo para invadir células, además de la información genética necesaria para la replicación de componentes virales dentro de la célula, información adicional para el empaquetamiento de los componente virales y la liberación de los virus.

Los fagos pueden distinguirse con base en su modo de propagación. Los fagos líticos producen numerosas copias de sí mismos y al hacerlo destruye a la célula huésped. Los fagos moderados tienen la propiedad de entrar a un estado no lítico de profago, en el que la replicación de su ácido nucleico está enlazada a la replicación del ADN de la célula huésped. Generalmente éstos son difíciles de descubrir y es aún más difícil de librar al cultivo de la infestación del fago.<sup>26</sup>

### **d) Mutación**

Se puede definir como el cambio del ADN, más precisamente como el cambio hereditario en la secuencia de los nucleótidos, esto por el paso evolutivo en los microorganismos y por alteraciones que producen diferentes cepas. Las mutaciones pueden ser sustituciones, supresiones, inserciones y reordenamiento de las bases.

La frecuencia de mutación se amplifica de modo notable por exposición de las células a mutágenos, un ejemplo, la luz ultravioleta (UV) es un mutágeno físico que lesiona el ADN y durante la reparación de este daño genético, pueden introducirse errores en la secuencia. Los mutágenos químicos pueden actuar por la alteración de la estructura física o química de las bases del ADN, por otra parte las mutaciones por desplazamiento del orden, introducción o supresión de un solo par de las bases del ADN, son causadas por un deslizamiento ligero en las cadenas de ADN. Cuando los cambios en la población genética llegan a ocurrir en los cultivos, no se recobra la forma original.<sup>26</sup>

### **e) Manejo por personal inexperto**

El personal clave debe estar altamente calificado y tener experiencia directa o entrenamiento especializado en el manejo de una colección de cultivos. La designación de especialistas en identificación y autenticación para mantenimiento de todos los grupos de microorganismos y con algunas habilidades sobre taxonomía, es esencial para el control de la calidad de la colección de cultivos. Cuando se requiera apoyo adicional con especialistas en taxonomía se deben establecer vínculos de colaboración.<sup>26</sup>

## **5. Colecciones de cultivos**

Las colecciones de cultivos microbianos son entidades en donde se realizan una serie de actividades cuyo objetivo fundamental es el de obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible un acervo de cultivos microbianos auténticamente puros, estables, y bien clasificados que sean de un interés específico y se encuentren disponibles sobre demanda, así como la información que de ellos se genere, siendo de tal forma, un factor decisivo en el desarrollo de la Microbiología en cualquiera de sus ramas y aplicaciones.<sup>28</sup>

Se llama cultivo al proceso de propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en crecimiento están haciendo réplicas de sí mismos, y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química. Los nutrimentos deben brindarles estos elementos de manera accesible desde el punto de vista metabólico, además de los factores que deben regularse durante el crecimiento como el pH, la temperatura, aeración, humedad y presión osmótica.<sup>29</sup>

El método más simple en la obtención de cultivos puros de microorganismos es la adquisición de subcultivos previamente aislados pertenecientes a una colección. Existen numerosas colecciones de cultivo que van desde pequeñas colecciones privadas a grandes colecciones públicas que pueden mantener millares de cepas de microorganismos. Las colecciones privadas están usualmente asociadas

con investigaciones especializadas en industrias, universidades, o institutos.<sup>30</sup>

La función básica de una colección de cultivo es la conservación, el almacenamiento y la distribución de los microorganismos, estas colecciones pueden almacenar bacterias, levaduras, hongos, actinomicetos y protozoarios. La necesidad de preservar y mantener estos microorganismos ha llevado a la formación de colecciones de cultivo en todo el mundo.<sup>7, 8</sup>

Existen una serie de grandes colecciones de hongos microscópicos, mantenidos en lo que son los principales centros de investigación, pero que se organizan para el suministro regular de los cultivos a otras instituciones, las empresas y los trabajadores individuales. El mayor y más conocido de ellos es el Centraalbureau Voor Schimmelcultures, en Baarn, Países Bajos.

En el Reino Unido, los hongos son ofrecidos por el Commonwealth Mycological Institute, que publica un catálogo. Otros microorganismos se encuentran en colecciones de instituciones especializadas y muchos se enumeran en el directorio de colecciones de microorganismos mantenidos en el Reino Unido. Otros países tienen sus propias colecciones nacionales, industriales y de investigación, muchas de las cuales se enumeran en el directorio mundial.<sup>12</sup>

## **6. Material de referencia certificado**

Material o sustancia acompañado de un certificado, que posee valores de una o más propiedades, certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de dichas propiedades, para el cual cada valor certificado está acompañado por su incertidumbre, con un nivel de confianza establecido.

## **7. Cepas de referencia certificadas**

La cepas de referencia certificadas es un material de referencia certificado biológico. La colección certifica que suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

Asimismo, al tratarse de un material biológico pueden darse dificultades de certificación.

## **8. Medios de cultivo**

Existe una gran cantidad de medios de cultivos para la propagación y estudio de hongos, pero la mayoría han sido diseñados con alguna finalidad especial, tales como la seguridad de un crecimiento óptimo o para determinar la necesidad de una sustancia específica para un moho determinado. El medio de soporte y el crioprotector se eligen de acuerdo con el microorganismo.<sup>31</sup>

## **9. Control de calidad de pureza y viabilidad**

Este control se realiza a diferentes niveles del proceso; asimismo, se desempeña cada vez que se realiza una resiembra. El objetivo de dicho control es el de asegurarse que las cepas conservan su viabilidad y sus caracteres bioquímicos.

### **a) Frecuencia de realización de este control**

Es el laboratorio el que establece en cada caso la frecuencia de realización del control de calidad de pureza y viabilidad para las cepas de reserva almacenadas.

En caso de no ostentar las características establecidas se ejecuta la "acciones correctivas" que se establecen en el procedimiento.

### **b) Registro de Control de calidad de pureza y viabilidad de las cepas**

Fecha del control.

Identificación de la cepa. Género y especie del microorganismo. Tipo y N° de colección.

Tipo de cepa (Cepa de referencia, reserva o trabajo).

**c) Pruebas a realizar** (depende del microorganismo)

Coloración

Características de las colonias en medios selectivos

Pruebas bioquímicas y serológicas.

**d) Almacenamiento de las cepas**

Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo:

- Haga una suspensión densa del microorganismo en el medio de congelación elegido utilizando un asa recta estéril.
- Dispense de 1 a 1,5 mL de la suspensión en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales o criotubos) de 1,8 mL.
- Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.
- Coloque el vial en una caja de almacenamiento con la tapa resistente al frío y haga sucesivamente lo mismo con cada una de las cepas a conservar.
- Guarde la cepa a la temperatura elegida (-20 °C a -70 °C).
- Coloque el vial en una caja de almacenamiento con la tapa resistente al frío y haga lo mismo con cada una de las cepas a conservar.
- Cuando desee recuperar el microorganismo a partir del vial, tenga en cuenta que la descongelación debe ser un proceso rápido, debido a que su prolongación produce daño en las células y disminuye la viabilidad del microorganismo.

Proceda de la siguiente forma:

- Saque el vial de congelación. Tome con un asa recta estéril una pequeña parte del material congelado con el fin de no descongelar todo el vial.
- Siembre el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.
- Congele inmediatamente el vial.<sup>32</sup>

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

## **I. Planteamiento del problema**

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza se imparten las licenciaturas de Química Farmacéutico Biológica, Cirujano Dentista y Médico Cirujano, que dentro de sus planes y programas de estudio incluyen módulos de Microbiología, en sus manuales de prácticas de laboratorio se utilizan cepas microbianas que requieren estar viables puras y estables, en el momento en que sean requeridas.

Dentro de la carrera de Q. F. B. en el noveno semestre de la orientación Farmacia Industrial se imparte el módulo de Microbiología Farmacéutica y en la práctica aislamiento de microorganismos productores de ácidos orgánicos se ha logrado aislar 23 cepas de *A. niger* a partir de diferentes fuentes naturales y se cuenta además con una cepa de referencia de la colección ATCC, mismas que se han conservado durante 17 años por resiembra periódica en agar inclinado el cual es un método de mantenimiento a corto plazo; para evitar la pérdida y degeneración de estos cultivos se propuso la conformación de un cepario utilizando dos métodos de conservación a mediano plazo.

## I. Objetivos

### A. Objetivo general

Conformar un cepario utilizando 24 cepas de *Aspegillus niger* así como aplicar los métodos de conservación por congelación y mantenimiento bajo capa de aceite mineral, con el fin de mantenerlas puras estables y viables garantizando la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de tal forma que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible.

#### 1. Objetivos particulares

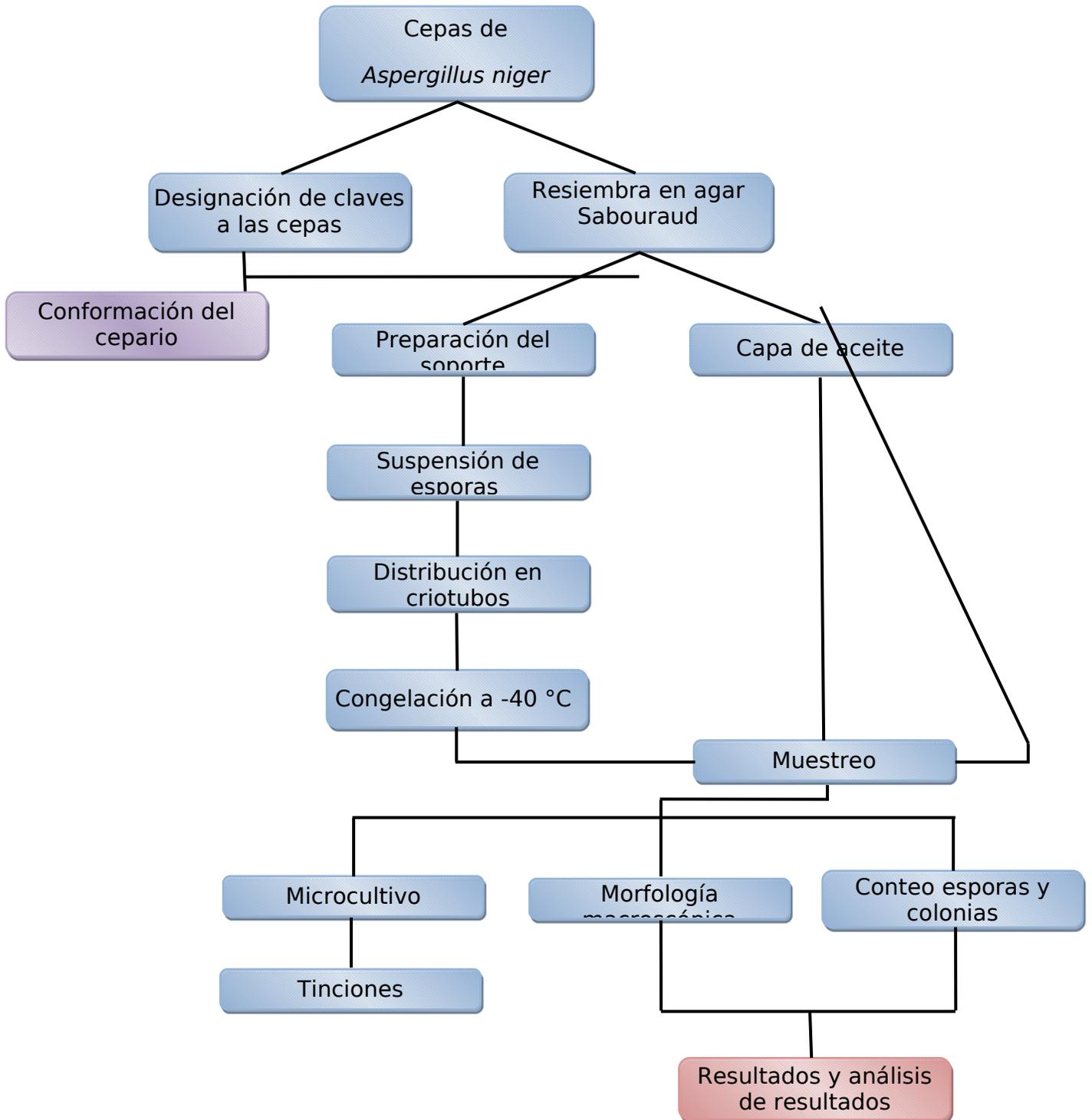
- Búsqueda de las fechas y fuentes de aislamiento de las cepas de *A. niger*.
- Asignación de claves e información a cada cepa.
- Mantenimiento y resiembra en agar inclinado.
- Realización de microcultivos y tinciones.
- Conservación con capa de aceite mineral.
- Conservación en congelación.
- Determinación de la viabilidad a cada cepa

## **I. Hipótesis**

Si se emplean los métodos de congelación y mantenimiento bajo capa de aceite mineral se podrán mantener las cepas fúngicas viables, puras y estables, evaluando cada mes estas características durante su mantenimiento se espera que no presenten cambios significativos en sus estructuras y viabilidad.

## I. Diseño experimental

### 1. Diagrama de flujo



## I. Método

### A. Materiales y métodos

#### 1. Material

Tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapón de vaquelita  
Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de vaquelita  
Tubos de ensaye de 15 x 120 mm  
Criotubos de 1.8 mL.  
Matraces Erlenmeyer  
Mecheros  
Gradillas  
Pipetas graduadas de 10, 1 y 0,5 mL  
Pipeta automática de 5 a 50 mL  
Puntas desechables de plástico para micropipeta  
Perlas de vidrio de 2mm  
Portaobjetos  
Cubreobjetos  
Papel filtro  
Triángulos de vidrio  
Cajas petri de 100 x 15 mm  
Cajas petri de 150 x 20 mm  
Asas bacteriológicas rectas  
Cámara de Neubauer

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

**a) Material biológico**

Cepas analizadas de *A. niger*

*Aspegillus niger* ATCC 20107

<b>Cepa</b>	<b>Fuente de aislamiento</b>
<i>Aspegillus niger</i>	Tierra 1
<i>Aspegillus niger</i>	Tierra 2
<i>Aspegillus niger</i>	Suelo 2
<i>Aspegillus niger</i>	Suelo 3
<i>Aspegillus niger</i>	Limón A
<i>Aspegillus niger</i>	Limón B
<i>Aspegillus niger</i>	Limón C
<i>Aspegillus niger</i>	Limón D
<i>Aspegillus niger</i>	Naranja
<i>Aspegillus niger</i>	Cebolla
<i>Aspegillus niger</i>	Agar Sangre
<i>Aspegillus niger</i>	Melón
<i>Aspegillus niger</i>	Cerveza
<i>Aspegillus niger</i>	Masa
<i>Aspegillus niger</i>	Toronja
<i>Aspegillus niger</i>	Almíbar
<i>Aspegillus niger</i>	Bioterio
<i>Aspegillus niger</i>	Producción
<i>Aspegillus niger</i>	Durazno
<i>Aspegillus niger</i>	Papaya
<i>Aspegillus niger</i>	Granada
<i>Aspegillus niger</i>	Guayaba 1
<i>Aspegillus niger</i>	Guayaba 2

**b) Equipos**

Balanza granataria

Ultracongelador a -40 °C

Microscopio óptico

Autoclave

Refrigerador 4 °C

**c) Medios de cultivo**

Agar Dextrosa Sabouraud  
Medio OGG  
Agar papa

#### **d) Reactivos**

Agua destilada  
Aceite mineral  
Leche desnatada al 10%  
Glicerina  
Fenol al 10%  
Metanol  
Etanol 96%  
Xilol  
Acetona  
Entellan  
Ácido acético

#### **e) Antibióticos**

Gentamicina inyectable  
Oxitetraciclina inyectable

#### **f) Colorantes**

Azul de algodón lactofenol  
Azul de algodón acético  
Eritrocina  
Rosa de bengala

## **2. Métodos**

### **a) Resiembra**

Agar Dextrosa Sabouroud (DSA)

pH final  $6,2 \pm 0,2$

Método:

Suspender 65 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Verter en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tapón de gasa y algodón. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Inclinar los tubos y dejar enfriar.

Procedimiento:

1. Sembrar las muestras en los tubos con agar inclinado
2. Incubar los tubos sembrados a 25-30 °C.
3. Examinar los cultivos a los 4, 5 y 6 días de incubación

Agar papa para microcultivo

Papa	200 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

pH final  $6,2 \pm 0,2$

Método:

Colocar en un vaso de precipitados de 1000 mL 200 g de papa finamente picada adicionar el agua destilada hasta cubrir la papa, poner a fuego lento hasta disolver la papa. Colar con una gasa para eliminar los grumos de esta preparación, adicionar el agar y la glucosa. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos y vaciar en cajas.

### **b) Preparación del soporte (leche descremada)**

Disuelva 10 g de la leche descremada en 100 mL de agua destilada. Esterilice a 121 °C por 15 minutos.

pH final  $6,3 \pm 0,2$

### **c) Suspensión celular**

Lavar las perlas con un detergente, luego con HCl diluido para neutralizar cualquier alcalinidad, seguido por los lavados sucesivos en agua del grifo hasta obtener el pH de esta, hacer un lavado final con agua destilada seguida de un secado a 45 °C. Aproximadamente 20-30 perlas de vidrio preparadas se introducen en criotubos con capacidad de 1,8 mL.

Hacer una suspensión densa del microorganismo en el medio de congelación elegido utilizando un asa recta estéril.

Dispense de 1 a 1,5 mL de la suspensión en los crioviales o criotubos de 1,8 mL con las perlas de vidrio. Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección. Colóquelo en una caja de almacenamiento con la tapa resistente al frío, haga sucesivamente lo mismo con cada una de las cepas a conservar. Guarde la cepa a la temperatura elegida (-20°C a -70°C).

### **d) Microcultivo**

1. El trabajo se realiza en condiciones de esterilidad mediante el uso de mecheros.
2. Se corta un cilindro de agar PDA o DSA de un centímetro de diámetro, con un grosor de aproximadamente 0,3 cm.
3. En la caja petri estéril, colocar en la base un triángulo de vidrio, sobre él un portaobjeto en el que se depositarán dos cilindros de agar separados 2,5 cm aproximadamente entre sí, para realizar esta operación se utiliza una espátula previamente esterilizada.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

4. Inocular los bordes del cilindro de agar en tres o cuatro lugares con una pequeña porción de la colonia a estudiar, mediante un asa recta o la punta de una aguja de disección.
5. Calentar con suavidad un portaobjeto pasándolo con suavidad por la llama de un mechero Bunsen y colocarlo de inmediato sobre el trozo de agar inoculado.
6. Al término de esta serie de operaciones, se depositan 5 mL de glicerina-agua en la base de la caja petri sin rebasar el nivel del triángulo de vidrio, se tapa la caja y se incuba a temperatura ambiente o a 30 °C de 3-7 días.
7. Cuando el desarrollo sea aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie del portaobjetos puede retirarse con suavidad de la superficie del agar con un par de pinzas.
8. Colocar el portaobjeto sobre una pequeña gota de azul de lactofenol aplicada a la superficie de otro portaobjeto de 76 x 26 mm. El preparado puede conservarse para estudios adicionales sellando los bordes del portaobjeto con líquido de montaje o esmalte de uñas transparente.
9. Después de que se extrajo el portaobjeto del o los cilindro (s) de agar, el bloque de agar puede separarse para ello, se despega del portaobjeto con un palillo de madera. Esta operación se realiza sobre un recipiente con fenol al 5%, sobre el cual se dejan caer los trozos de agar.

Nota: las características de las estructuras fúngicas son con base en el crecimiento en agar Sabouraud.

### **e) Tinciones**

#### **(1) Tinción con azul de algodón acético**

1. Fijar la preparación con metanol hasta evaporación.
2. Teñir con azul de algodón ácido por 15 minutos.

3. Lavar ligeramente con agua destilada.
4. Pasar por alcohol al 96%.
5. Pasar por alcohol absoluto.
6. Pasar por xilol por 5 minutos.
7. Montar la laminilla con Entellan.

## **(2) Tinción con eritrocina**

1. Fijar la preparación con metanol hasta evaporación.
2. Teñir con eritrosina de 10 a 15 minutos en emisiones de baño de agua o por calentamiento directo a la flama.
3. Pasar por etanol
4. Baño de acetona por 10 minutos.
5. Baño de xilol - acetona (1:2) durante 10 minutos.
6. Baño de xilol por 10 min.
7. Montar la laminilla con Entellan.

## **f) Conteo de esporas**

Adicionar 1 y 0,5 mL agua destilada a tubos de 13 x 100 mm con tapón de vaquelita, hacer un duplicado de éstos últimos a los cuales se les adicionará colorante azul de Evans y no se esterilizaran (el colorante es para que se tiñan las esporas y poderlas observar mejor al microscopio). Los tubos que no contienen colorante esterilizarlos en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Se prepara una suspensión de esporas con 0,1 mL de la muestra en 1 mL agua destilada estéril, posteriormente se realizan diluciones hasta llegar a 1:20 para realizar el conteo de las esporas en la Cámara de Neubauer.

## **g) Viabilidad del hongo**

### **(1) Recuento de hongos**

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

Medio OGG (Agar oxitetraciclina gentamicina glucosa extracto de levadura).<sup>37</sup>

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1,0 L

pH final  $6,5 \pm 0,1$

Disolver completamente los ingredientes y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C. Enfriar hasta aproximadamente 50 °C, añadir 100 mL de una solución de 1 mg/mL de oxitetraciclina y 50 mL de una solución de 1mg/mL de gentamicina. Vaciar en cajas petri de 150 x 20 mm.

#### Agar blando

Caldo Sabouraud	9,0 g
Agar	2,1 g
Agua destilada	300 mL

pH final  $6,2 \pm 0,2$

Suspender los ingredientes en el agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Verter 10 mL en tubos de ensayo de 15 x 120 mm con tapón de gasa y algodón. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Mantenerlos en baño María a 40 °C.

#### Técnica

Depositar alícuotas de 0,005 mL de la última dilución sin colorante, en el agar blando (dilución final 1:40000) agitar en el vortex y verter en placas con el medio OGG; extender el inóculo sobre la superficie del medio. Incubar las placas sembradas durante 5 días a temperatura ambiente. Observar a partir de los 2 días de incubación el crecimiento. Contar el número de colonias antes de que éstas se junten. Calcular el

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

número de unidades propagadas de hongos por mL Leer la morfología macroscópica de las colonias crecidas.

### **h) Conservación en capa de aceite**

En condiciones asépticas, se vierte aceite mineral estéril en un cultivo con abundante conidiación, el aceite debe cubrir todo el cultivo, de tal manera que el cultivo quede a 1 cm por debajo del borde del tapón de rosca. Cerrar el tubo y conservarlo a temperatura ambiente.

## Resultados

La clave asignada a cada cepa se realizó de la siguiente manera <sup>38</sup>

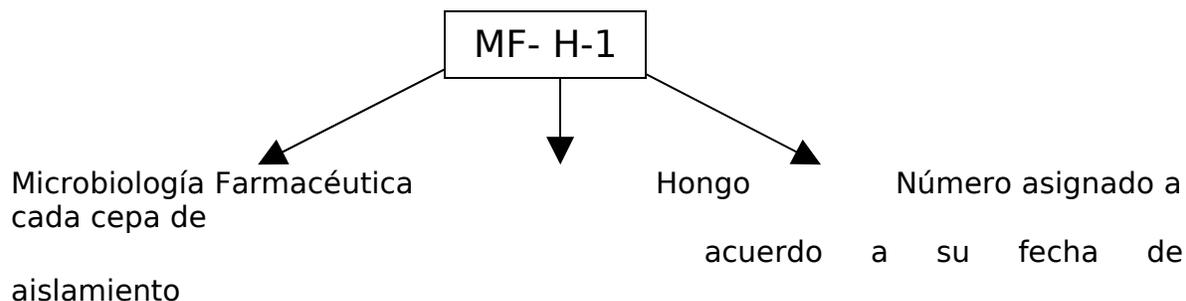


Tabla 1. Cepario conformado de cepas de *A. niger*

Clave asignada	Responsable, fuente y año de aislamiento, medio y temperatura de conservación.
MF-H-1	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González ATCC 20107, 1991, DSA, 25 °C
MF-H-2	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Limón A, 1991, DSA, 25 °C
MF-H-3	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Tierra 1, 1991, DSA, 25 °C
MF-H-4	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Limón B, 1993, DSA, 25 °C
MF-H-5	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Naranja, 1993, DSA, 25 °C
MF-H-6	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Guayaba 1
MF-H-7	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Guayaba 2, 1993, DSA, 25 °C
MF-H-8	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Laboratorio de producción, 1993, DSA, 25 °C
MF-H-9	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Toronja, 1993, DSA, 25 °C
MF-H-10	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Cebolla, 1996, DSA, 25 °C
MF-H-11	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Masa, 1996, DSA, 25 °C
MF-H-12	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Cerveza, 1996, DSA, 25 °C
MF-H-13	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Limón C, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-14	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Limón D, 2003, DSA, 25 °C

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

MF-H-15	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Agar sangre, 2003, DSA, 25 °C
Continuación de la tabla 1	
MF-H-16	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Bioterio, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-17	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Suelo 2, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-18	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Suelo 3, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-19	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Durazno, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-20	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Melón, 2003, DSA, 25 °C
MF-H-21	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Almíbar , 2005, DSA, 25 °C
MF-H-22	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Tierra 2, 2008, DSA, 25 °C
MF-H-23	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Papaya, 2008, DSA, 25 °C
MF-H-24	Q.B.P. Dora Alicia Pérez González Granada, 2008, DSA, 25 °C

Como se puede observar en las gráficas de las figuras 1, 2 y 3, el conteo de esporas es relacionado con la viabilidad del *A. niger* esto para determinar que el número de esporas contadas fueran aproximadamente las mismas que crecieron, indicando la viabilidad de las cepas, con esta evaluación se observa que las cepas congeladas a -40 °C se mantienen viables contrario con las cepas conservadas con una capa de aceite mineral las cuales muestran decadencia.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

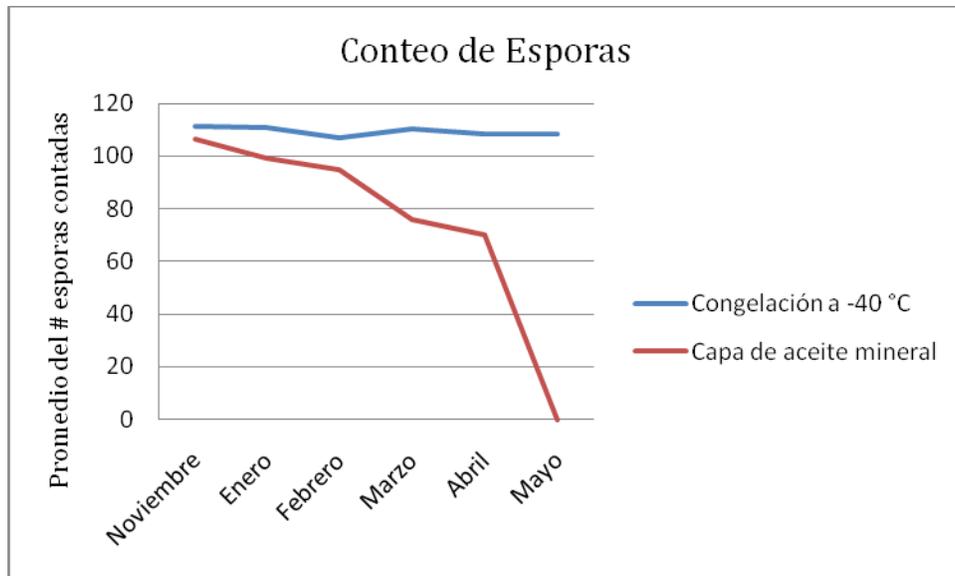


Figura 1. Conteo de esporas de *A. niger* conservadas en los dos métodos empleados.

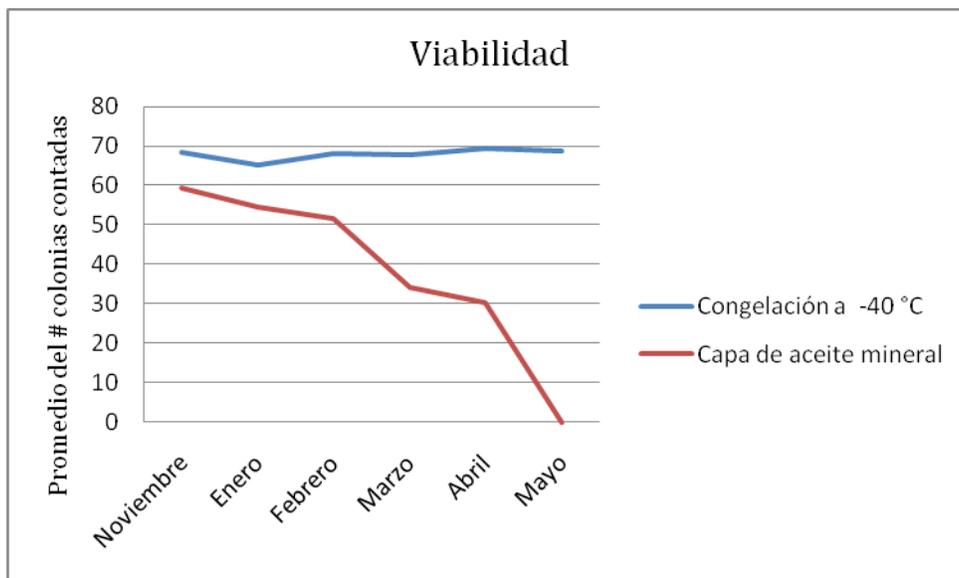


Figura 2. Viabilidad del *A. niger* conservadas en los dos métodos empleados.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

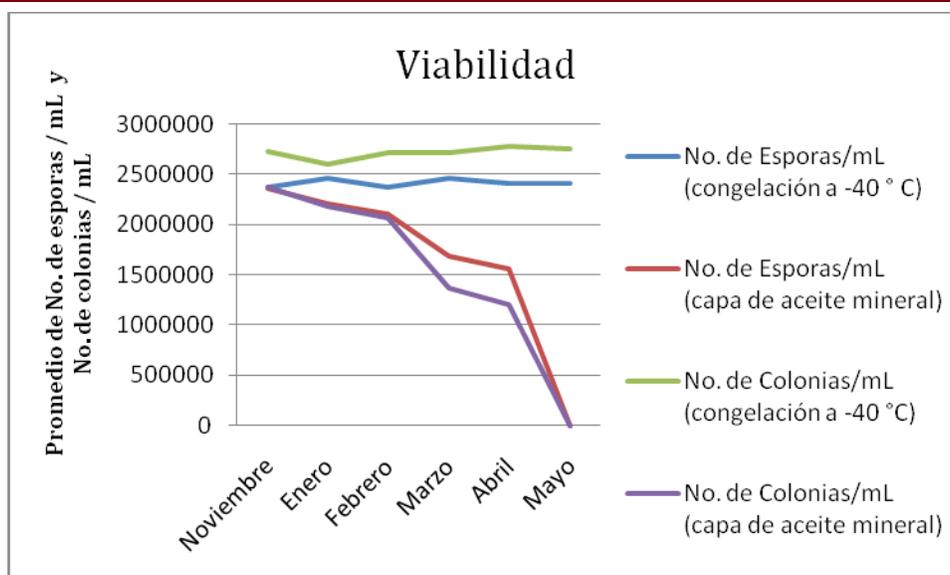


Figura 3. Comparación del conteo de esporas y viabilidad del *A. niger* conservadas en los dos métodos empleados.

Como se observa en la tabla 3 la viabilidad de las cepas de *A. niger* fueron por arriba del 80% para las cepas conservadas en congelación suspendidas en un agente crioprotector contrario a las cepas conservadas bajo una capa de aceite mineral (tabla 5) que muestran decadencia conforme pasa el tiempo.

Tabla 2. Porcentajes del conteo de esporas conservadas en congelación a - 40 °C (No. Esporas / mL).

Cepa	t=0	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
1	100	91.7647	98.2353	102.9412	93.5294	101.1765
2	100	106.0241	98.7952	103.6145	91.5663	96.3855
3	100	111.3636	97.7273	104.5455	93.1818	90.9091
4	100	104.7619	98.4127	96.8254	95.2381	93.6508
5	100	93.1818	90.9091	97.7273	95.4545	104.5455
6	100	91.6667	87.5000	95.8333	91.6667	83.3333
7	100	94.9153	93.2203	101.6949	96.6102	106.7797

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

<b>8</b>	100	94.5946	89.1892	94.5946	86.4865	83.7838
<b>9</b>	100	97.7778	88.8889	113.3333	111.1111	91.1111
<b>10</b>	100	105.7471	98.8506	104.5977	95.4023	109.1954
<b>11</b>	100	103.5714	89.2857	97.3214	101.7857	98.2143
<b>12</b>	100	98.6111	98.6111	95.8333	105.5556	94.4444
<b>13</b>	100	93.2886	92.6174	104.0268	102.6846	91.9463
<b>14</b>	100	93.8462	93.0769	90.7692	97.6923	94.6154
<b>15</b>	100	92.5170	97.2789	104.0816	97.9592	106.8027
<b>16</b>	100	102.4390	94.3089	99.1870	103.2520	95.1220
<b>17</b>	100	106.7568	94.5946	98.6486	104.0541	93.2432
<b>18</b>	100	98.3333	102.5000	98.3333	95.8333	100.8333
<b>19</b>	100	101.8182	94.5455	98.1818	103.6364	90.9091
<b>20</b>	100	109.2593	94.4444	101.8519	92.5926	105.5556
<b>21</b>	100	92.2481	96.8992	99.2248	102.3256	93.0233
<b>22</b>	100	104.5139	92.0139	93.4028	94.7917	104.1667
<b>23</b>	100	97.3451	98.2301	100.5900	94.6903	92.0354
<b>24</b>	100	103.9648	102.2026	95.5947	93.8326	92.5110

Tabla 3. Porcentajes del conteo de esporas viables conservadas en congelación a - 40 °C  
(No. Esporas viables/mL)

<b>Cepa</b>	<b>t=0</b>	<b>Enero</b>	<b>Febrero</b>	<b>Marzo</b>	<b>Abril</b>	<b>Mayo</b>
<b>1</b>	100	90.9091	103.0303	98.9898	119.1919	106.0606
<b>2</b>	100	93.4783	108.6956	91.3043	108.6956	115.2173
<b>3</b>	100	95.4545	90.9090	104.5454	113.6363	90.9090
<b>4</b>	100	90.9091	103.0303	93.9393	118.1818	112.1212
<b>5</b>	100	94.7368	110.5263	89.4736	115.7894	105.2631
<b>6</b>	100	94.4444	97.2222	91.6666	105.5555	111.1111
<b>7</b>	100	93.75	90.625	90.625	103.125	93.75
<b>8</b>	100	88.2353	105.8823	88.2352	117.6470	94.1176
<b>9</b>	100	101.3158	103.9473	98.6842	102.6315	88.1578
<b>10</b>	100	91.1111	88.8888	95.5555	104.4444	111.1111
<b>11</b>	100	89.2857	101.7857	92.8571	105.3571	80.3571
<b>12</b>	100	94.8718	102.5641	89.7435	110.2564	117.9487
<b>13</b>	100	90.9574	96.2765	98.9361	94.6808	93.6170
<b>14</b>	100	102.9412	98.5294	110.2941	97.0588	114.7058
<b>15</b>	100	101.3158	97.3684	92.1052	88.1578	101.3157
<b>16</b>	100	94.2029	97.1014	102.8985	105.7971	107.2463

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

<b>17</b>	100	92.1053	97.3684	105.2631	92.1052	107.8947
<b>18</b>	100	101.3889	101.3888	97.2222	102.7777	108.3333
<b>19</b>	100	87.0968	103.2258	106.4516	112.9032	96.7741
<b>20</b>	100	106.8966	93.1034	103.4482	86.2068	106.8965
<b>21</b>	100	105.0633	112.6582	111.3924	112.6582	101.2658
<b>22</b>	100	93.5484	96.7741	101.2903	96.7741	96.7741
<b>23</b>	100	94.6809	95.7446	101.0638	97.8723	95.2127
<b>24</b>	100	96.063	101.5748	98.4519	94.4881	101.5748

Tabla 4. Porcentajes del conteo de esporas de cepas conservadas con capa de aceite mineral (No. Esporas / mL)

<b>Cepa</b>	<b>t=0</b>	<b>Enero</b>	<b>Febrero</b>	<b>Marzo</b>	<b>Abril</b>	<b>Mayo</b>
<b>1</b>	100	93.75	103.125	68.75	67.7083	0
<b>2</b>	100	106.5789	94.7368	72.3684	67.1052	0
<b>3</b>	100	104.9504	73.2673	53.4653	77.2277	0
<b>4</b>	100	96.8253	76.9841	67.4603	64.2857	0
<b>5</b>	100	108.3333	84.375	46.875	58.3333	0
<b>6</b>	100	73.3944	103.6697	71.5596	66.9724	0
<b>7</b>	100	88.1578	105.2631	72.3684	69.7368	0
<b>8</b>	100	107.4074	75.3086	58.0246	50.6172	0
<b>9</b>	100	77.7777	104.2735	74.3589	66.6666	0
<b>10</b>	100	93.4782	73.9130	77.1739	70.6521	0
<b>11</b>	100	98.8636	95.4545	60.2272	63.6363	0
<b>12</b>	100	96.2025	107.5949	54.4303	84.8101	0
<b>13</b>	100	88.7096	99.1935	71.7741	70.9677	0
<b>14</b>	100	88.3116	87.0129	74.0259	64.9350	0
<b>15</b>	100	81.6513	105.5045	81.6513	60.5504	0
<b>16</b>	100	86.2068	106.8965	80.1724	68.9655	0
<b>17</b>	100	93.3333	98.0952	74.2857	69.5238	0
<b>18</b>	100	89.9441	85.4748	85.4748	63.1284	0

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

<b>19</b>	100	87.2340	64.8936	64.8936	59.5744	0
<b>20</b>	100	103.8461	75	75	60.5769	0
<b>21</b>	100	105.6603	96.2264	84.9056	67.9245	0
<b>22</b>	100	88.3495	73.7864	73.7864	60.1941	0
<b>23</b>	100	91.5032	84.9673	84.9673	66.0130	0
<b>24</b>	100	109.0909	71.0743	67.7685	62.8099	0

Tabla 5. Porcentajes del conteo de esporas viables de cepas conservadas con capa de aceite mineral (No. Esporas viables / mL).

<b>Cepa</b>	<b>t=0</b>	<b>Enero</b>	<b>Febrero</b>	<b>Marzo</b>	<b>Abril</b>	<b>Mayo</b>
<b>1</b>	100	94.6428	80.3571	60.7142	44.6428	0
<b>2</b>	100	90.625	128.125	78.125	34.375	0
<b>3</b>	100	134.7826	110.1449	62.3188	33.3333	0
<b>4</b>	100	76.7123	72.6027	45.2054	39.7260	0
<b>5</b>	100	94.9152	76.2711	50.8474	54.2372	0
<b>6</b>	100	84.5070	70.4225	63.3802	46.4788	0
<b>7</b>	100	82.5	127.5	55	42.5	0
<b>8</b>	100	106.5217	97.8260	56.5217	45.6521	0
<b>9</b>	100	80.2816	107.0422	71.8309	45.0704	0
<b>10</b>	100	86.7924	79.2452	73.5849	50.9433	0
<b>11</b>	100	98	78	50	42	0
<b>12</b>	100	97.9166	89.5833	39.5833	37.5	0
<b>13</b>	100	79.0322	87.0967	53.2258	51.6129	0
<b>14</b>	100	93.5897	84.6153	65.3846	50	0
<b>15</b>	100	88.8888	72.2222	40.7407	50	0
<b>16</b>	100	66.0714	60.7142	55.3571	60.7142	0
<b>17</b>	100	75.4098	86.8852	44.2622	73.7704	0
<b>18</b>	100	104.8192	90.3614	62.6506	73.4939	0
<b>19</b>	100	98.0769	98.0769	44.2307	65.3846	0
<b>20</b>	100	90.1408	84.5070	40.8450	57.7464	0
<b>21</b>	100	93.5483	54.8387	61.2903	67.7419	0
<b>22</b>	100	72.7272	89.3939	69.6969	50	0

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

<b>23</b>	100	105.7471	96.5517	66.6666	51.7241	0
<b>24</b>	100	98.2758	72.4137	58.6206	39.6551	0

**Morfología macro y microscópica de *A. niger***



Figura 4. Cepas de *A. niger* en tubos de 18 x 150 mm antes de adicionarle el aceite mineral estéril.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”



Figura 5. Cepas de *A. niger* en tubos de 18 x 150 mm después de adicionarle el aceite mineral estéril.

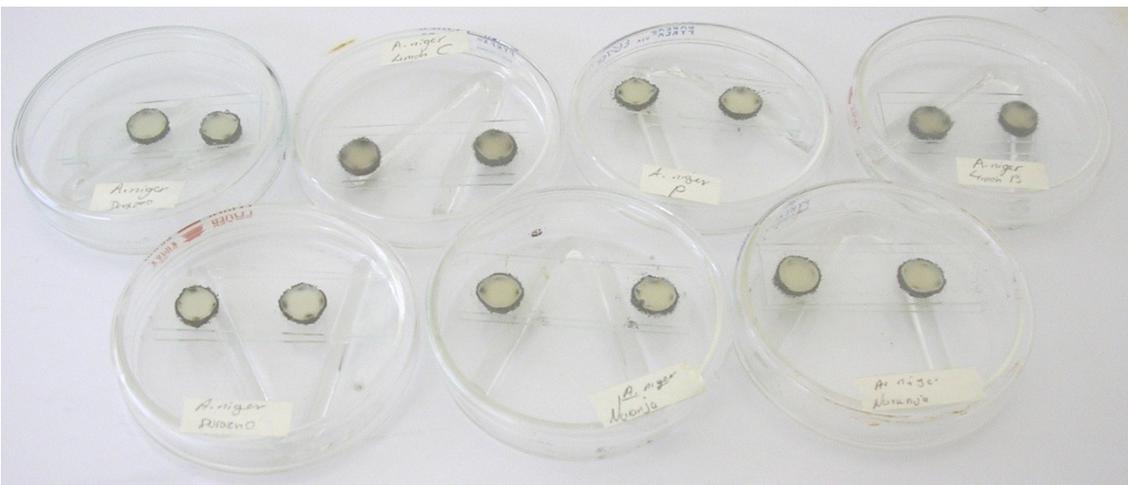


Figura 6. Microcultivo para realiza las tinciones de *A. niger*

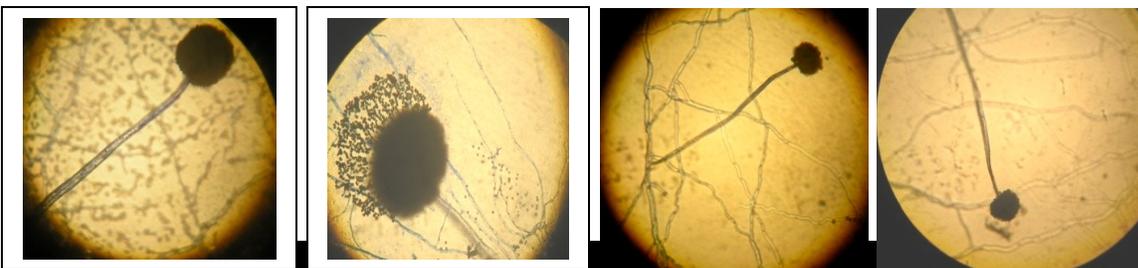


Figura 7. Morfología microscópica de *A. niger* con tinción de azul de algodón acético

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

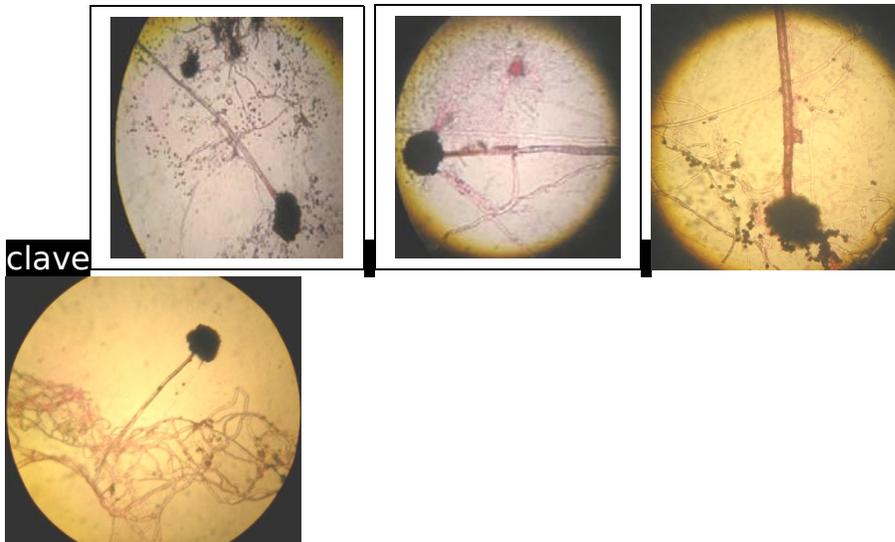


Figura 8. Morfología microscópica de *A. niger* con tinción de eritrocina

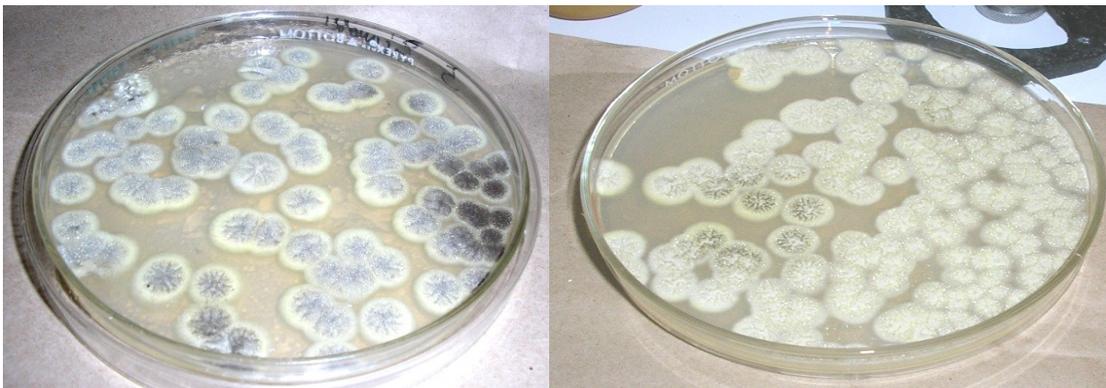


Figura 9. Morfología macroscópica de *A. niger*

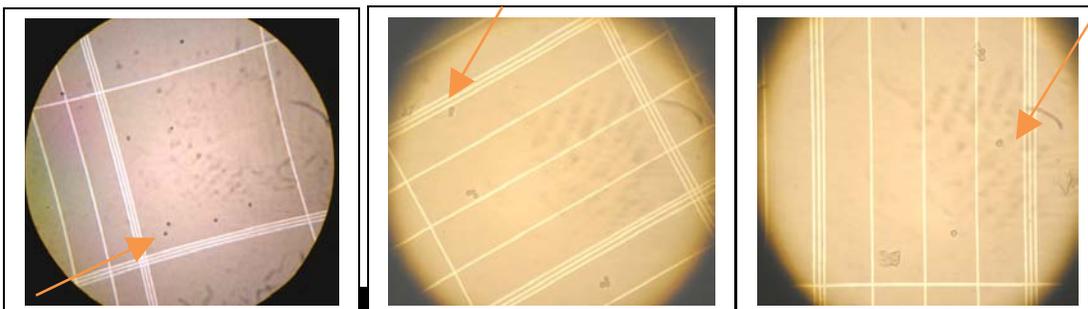


Figura 10. Conteo de esporas en cámara de Neubauer

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

## **Análisis de resultados**

En el presente estudio se conformó un cepario con 24 cepas de *A. niger* utilizando los métodos de congelación a -40 °C y conservación cubriendo completamente el cultivo en medio sólido inclinado con una capa de aceite mineral.

Se evaluó el método de conservación a -40 °C utilizando leche descremada al 10% como crioprotector, esto para asegurar que las células no fueran dañadas por la formación de cristales al congelarse la suspensión del medio, este método fue comparado con el de capa de aceite mineral; ambos fueron monitoreados cada mes para poder evaluar las características de cada cepa así como su viabilidad.

Con respecto a la viabilidad se realizó una serie de diluciones para procesar mejor la muestra y poder contar en la cámara de Neubauer el número de esporas/mL, así como la siembra de estas en medio OGG extracto de levadura y poder determinar el porcentaje de la viabilidad de las esporas contadas de cada cepa con respecto a las colonias crecidas, esto para obtener un resultado más confiable, ya que la viabilidad reportada tan sólo es evaluada con base en el crecimiento del microorganismo. En las tablas 2 y 3, de resultados muestran que la viabilidad de las cepas congeladas se mantiene por arriba del 80%; comparando el conteo de esporas con respecto al número de colonias se observa que hay variaciones pequeñas y esto es debido a que el tamaño de las esporas no es uniforme, además de que en algunas muestras se encontraron fragmentos de micelio y gar. El porcentaje mencionado anteriormente es comparado con los resultados del artículo de la referencia (Rico M) <sup>14</sup> que refieren que todas sus cepas fueron reactivadas exitosamente después de la crioconservación tomando en cuenta que los conservados eran relativamente jóvenes ya que los más antiguos databan de 3 años, en comparación con la mayoría de las cepas utilizadas en este estudio.

Por otro lado las cepas conservadas bajo aceite mineral mostraron decadencia con forme pasó el tiempo como se muestra en las tablas 4 y 5 de resultados, en este caso al ser sometidas a una reducción de oxígeno al medio por efecto de la capa de aceite mineral, pudo ser perjudicial para el microorganismo debido a que las cepas no eran jóvenes y resistieron muy poco a este método de conservación: por eso es importante comenzar con un cultivo joven, puro y en buen estado es

## “Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

para asegurar una correcta conservación de todas sus características morfológicas y fisiológicas. Henao I, Correa F, Marín G.<sup>35</sup>, mencionan que en la conservación bajo capa de aceite las técnicas instrumentales para llevar cabo una correcta recuperación del microorganismo no ofrecen la confiabilidad necesaria debido a que a las 12 horas de conservación se determinó la pérdida de viabilidad, consecuencia que no se esperaba, debido a que el fundamento de la técnica es disminuir la tasa metabólica generada por la disminución de la transferencia de oxígeno. Cabe mencionar que en algunas referencias este método de conservación lo establecen como efectivo pero hay que tomar en cuenta el material y medio de cultivo que utilizaron, lugar donde se realizó el método, clima, experimentador, etc.

La morfología macro y microscópica se observó en los cultivos de esporas que se emplearon para determinar la viabilidad. Las placas sembradas se incubaron a temperatura ambiente y se examinaron a intervalos apropiados hasta un total de 7 días, observando que la morfología de las colonias, estructuras, y la pigmentación del medio no variaban en comparación con los cultivos originales, en el caso del método de conservación por congelación, mientras que las cepas conservadas bajo una capa de aceite mineral, en los últimos muestreos tardaban más de 10 días en esporular.

En cuanto a la pureza de las cepas ambos métodos mostraron cepas libres de contaminación al ser manipuladas por una sola persona, ya que cuando se encontraban más de dos personas al momento de sembrar las corrientes de aire generadas provocaban una contaminación ligera en los medios de cultivo. Pero se puede determinar que las cepas son puras.

La estabilidad de las características estructurales en las cepas estudiadas solo se pudo determinar en las cepas congeladas donde mantuvieron estas características y su viabilidad sin modificaciones. En el caso de las cepas conservadas bajo capa de aceite mineral, disminuyó su viabilidad con el paso del tiempo y las pocas colonias que crecían no esporulaban o lo hacían en menor grado.

Este estudio queda abierto para su seguimiento ya que sería conveniente analizar la producción de ácido cítrico de cada cepa actualmente para determinar si el método de conservación ahora empleado no afecta la actividad del microorganismo como productor de dicho ácido orgánico.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

---

## **Conclusiones**

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del método de conservación en congelación a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un apropiado agente crioprotector, ya que los resultados son satisfactorios al obtener un porcentaje de viabilidad adecuada, así como las características y pureza requeridas para las cepas de *A. niger*, por otro lado un cultivo debe estar en un estado óptimo al ser conservado. Idealmente, los cultivos deben ser jóvenes. Cuando un cultivo se ha mantenido por mucho tiempo en resiembras periódicas se puede alterar tanto su morfología, fisiología y ser poco apto para ser conservado por algún método; las cepas deterioradas pueden morir durante el método de conservación como en el caso de las cepas conservadas bajo capa de aceite mineral. Cabe mencionar que ninguna técnica de conservación es 100% efectiva esto dependerá de la disposición del laboratorio, material, equipo, personal capacitado, lugar y tipo de microorganismo a conservar.

## REFERENCIAS

1. Schlegel GH. Microbiología General. Barcelona: Omega; 1997.
2. Granados PR, Villaverde PC. Microbiología. 2ª. México: Paraninfo Thomson Learning; 2002.
3. Tay J. Microbiología y parasitología médicas. 3ª ed. México. Méndez editores; 2003.
4. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2ª ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1999.
5. Arenas GR. Micología Médica Ilustrada. 3ª ed. México: McGraw - Hill; 2008.
6. Prats G. Microbiología Clínica. ed. Médica panamericana. México. 2006.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico, 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1999.
8. López MR, Méndez TLJ. Micología Médica. México: Trillas; 1995.
9. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Argentina: Salta: 2003, v.1.
10. [Microbiología General I, FES Zaragoza, UNAM, microbiologia1.blogspot.com](http://microbiologia1.blogspot.com); Última actualización: febrero 2009 [en línea]. acceso el 25 de julio de 2009. Disponible en [http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus\\_spp.htm](http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus_spp.htm)
11. Ingraham LJ. Introducción a la microbiología. 1ª edición. Barcelona: Reverte; 1998.
12. Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Microbiología industrial. Washington, D.C.: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos; Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1994.
13. Feltham R K, et al. [Short communication a](#) . immersing the vials in boxes containing solid CO .Alternatively, a block of paraffin wax in a tin box, with vertical holes. April 1978 [en línea]. acceso. Junio de 2009. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1978.tb00804.x>
14. Rico M, Piattoni C, González C, Monela R, Latorre M, Lurá M. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. 2004 [en línea]. acceso junio 2009. Disponible en: [http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/publicaciones/bitstream/1/889/1/FABICIB\\_8\\_2004\\_pag\\_163\\_172.pdf](http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/publicaciones/bitstream/1/889/1/FABICIB_8_2004_pag_163_172.pdf)
15. Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos [en línea]. acceso junio de 2009. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis260.pdf>
16. Leveau J, Bouix M. Microbiología Industrial. Zaragoza: Acribia; 2000.
17. Onions, A. Smith's Introduction to Industrial Mycology. 7ª edición. London: Halsted Press. 1981.

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

18. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying. *J Microbiological Methods*. 2006; 66 (2):183-193.
19. Soriano AR. Conservación de bacterias por conservación [Tesis Licenciatura]. México, DF. UNAM; 2008
20. Arias RS. Criopreservación, bases físico-químicas, diferencias entre congelación rápida y controlada, control de calidad. [Tesis Licenciatura]. México, DF. UNAM; 2001.
21. Forbes BA, Sahm DF, Weisfeld AS. *Bailey & Scott, diagnóstico microbiológico*. 11<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2002.
22. McGann LE. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1978; 8: 489- 498.
23. Hill LR, Kirsop BE. *Living resources for biotechnology: Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
24. Hunter CJ, Belt A. *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. E. U. : Academic Press; 1996
25. Thoma RW. *Benchmark Paper in microbiology, industrial microbiology*. Vol. 12. Inc. Pennsylvania. USA: Editorial Dowden, Hutchinson & Ross; 1977.
26. [Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos](http://www.monografias.com/trabajos-pdf/colecciones-cultivos-microbianos/colecciones-cultivos-microbianos.pdf) [en línea]. acceso 16 de junio de 2009 .Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/colecciones-cultivos-microbianos/colecciones-cultivos-microbianos.pdf>
27. [Informe final del Proyecto E016 Colección de microorganismos del CINVSTAV-IPN](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/.../InfE016.pdf), conabio.gob.mx [en línea]. acceso 20 de julio de 2009. Disponible en [www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/.../InfE016.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/.../InfE016.pdf)
28. Jawetz ED, Meink JL, Adelberg EA. *Microbiología médica*. 15<sup>a</sup>. ed. México: El manual moderno; 1996
29. Prescott CS. *Industrial microbiology*. Westport, Connecticut: Avi Publishing. Company Inc; 1982.
30. Cepas de referencia [\[en línea\]](http://bioaplicaciones.galeon.com/ENAC/micro/PageA2.html). acceso 16 de junio de 2009 .Disponible en <http://bioaplicaciones.galeon.com/ENAC/micro/PageA2.html>
31. Baker JF. *Manual de Técnicas de Micología Médica*. Zaragoza: Acribia; 1990.
32. [NIVEL. Organización cepario \[1\].doc](http://intranet.gobhuila.gov.co/calidad/.../organizacion%20cepario.doc), acceso 20 de julio de 2009. Disponible en: [intranet.gobhuila.gov.co/calidad/.../organizacion%20cepario.doc](http://intranet.gobhuila.gov.co/calidad/.../organizacion%20cepario.doc)
33. Hawksworth D. L. *Filamentous Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988.
34. Smith J. E. *Aspergillus Biotechnology Handbooks*. New York :Plenum Press;1994

“Conformación de un cepario de *A. niger* e implementación de dos métodos de conservación”

---

35. Henao I, Correa F, Marín G. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica [en línea] acceso 16 de noviembre de 2009. Disponible en: [http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/.../EVALUACION\\_METODO\\_S.pdf](http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/.../EVALUACION_METODO_S.pdf)
36. Brown M.R. Microbiological Quality Assurance. New York: CRC Press; 1995.
37. Mossei DA. Microbiología de los alimentos. España: Acribia; 1992.
38. Ayala A, Philippe B, Hummelt G, Piñera G, Rosenstein Y, Negrete MG. Catálogo de Microorganismos. Instituto de Investigaciones Biomédicas, departamento de biotecnología. UNAM; 1988.

ANEXO

Fórmulas

No. de esporas /mm<sup>3</sup> = (No. contado \* FD) / (No. de cuadrantes \* 0.1mm)

No. de esporas viables= No. de colonias contadas \* FD