



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



“CONFORMACIÓN DE UN CEPARIO DE *A. NIGER* E IMPLEMENTACIÓN DE DOS TÉCNICAS 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:

ROSAALBA MALDONADO ANDRÉS

DIRECTOR: MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

ASESOR: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN

2011



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.

DEDICATORIA:

A mis padres **José Alfredo Maldonado Santiago** y **Martina Andrés Maldonado**, por su apoyo y confianza que me han brindado en la vida. Por sus motivaciones para culminar mi carrera.

A mis hermanos **Alfredo, Luis Alberto, Rubén** por todo su apoyo y comprensión, cariño y motivación. Por ser parte de mis motivaciones en la vida.

A mis hermanas **Gloria y Alma Delia** por todo su apoyo y cariño, por ser parte de mis inspiraciones.

A mi abuelito **Lázaro Maldonado Maldonado** por sus enseñanzas y su apoyo incondicional.

A la **Dra. Leticia Rodríguez Domínguez** por sus enseñanzas, contribución, apoyo incondicional y motivación para triunfar en la vida. Por la tolerancia y comprensión que me ha brindado.

AGRADECIMIENTOS

Mtra. Dora Alicia Pérez González

Por el apoyo, enseñanzas y el tiempo dedicado, al presentar este trabajo.

Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Por su paciencia, tiempo y enseñanzas para realizar este trabajo.

A mis sinodales: **Q.F.B. Beatriz Arellano Pimentel, M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, I.B.I. Susana Méndez Vázquez** por su disponibilidad y sugerencias en la revisión de este trabajo.

A la gran institución que es la **U.N.A.M.** por la oportunidad y apoyo que me ha brindado para la realización y culminación de la carrera de Q.F.B.

Lic. Juan Mario Pérez Martínez

Por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Métodos de aislamiento de microorganismos	
1.2. Tipos de aislamiento	4
1.2.1. Aislamiento directo	
1.2.2. Aislamiento por enriquecimiento	
1.3. Selección de microorganismos	
1.4. Colecciones de cultivos	5
1.5. Cultivos puros	
1.6. Material de referencia certificado	6
1.7. Cepas de referencia certificadas	
1.8. Mantenimiento o conservación de los cultivos	
1.8.1. Subcultivos	7
1.8.2. Mantenimiento bajo capa de aceite mineral	8
1.8.3. Congelación	
a) Los agentes crioprotectores	9
(1) Agentes penetrantes	11
(2) Agentes no penetrantes	
b) Almacenamiento de las cepas	12
1.8.4. Cultivos en tierra	
1.8.5. Preservación en celulosa	13
1.8.6. Liofilización	
1.8.7. Agua estéril	14
1.9. Problemas de pérdida y degeneración de cepas	15
1.9.1. Contaminación por otros microorganismos	
1.9.2. Manejo por personal inexperto	
1.9.3. Infestación por ácaros	
1.9.4. Infestación por fagos	
1.9.5. Mutación	16
1.10. Generalidades de los hongos	
1.10.1. Identificación de los hongos	17
a) Morfología macroscópica	
b) Morfología microscópica	
c) Preparado por disgregación	18

d) Preparados con cinta adhesiva transparente	
e) Análisis a través del tubo	
f) Microcultivo	
1.11. El género <i>Aspergillus</i>	19
a) Morfología macro y microscópica	
b) Medios de cultivo	21
c) Fisiología	22
d) Importancia industrial del género	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. OBJETIVOS	
IV. HIPOTESIS	
V. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	26
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	
1. MATERIAL	
a) Material	
b) Material biológico	27
c) Equipos	28
d) Medios de cultivo	
e) Reactivos	
f) Antibióticos	
g) Colorantes	
2. MÉTODOS	29
a) Resiembra de cultivos	
b) Microcultivo	
c) Tinciones	30
(1) Tinción con Azul de Algodón Acético	
(2) Tinción con Eritrocina	
d) Conservación por congelación a -40 °C	31
(1) Preparación del soporte	
(2) Suspensión celular	
e) Conservación en capa de aceite mineral	32
f) Viabilidad del hongo	
g) Conteo de esporas	33
h) DIAGRAMA DE FLUJO	34
VII. RESULTADOS	35
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
IX. CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

Se conformó el cepario de 24 cepas de *A. niger*, documentando fecha y fuente natural de aislamiento, 23 fueron aisladas y mantenidas en el módulo Microbiología Farmacéutica, se cuenta con una cepa de referencia perteneciente a la colección ATCC, éstas se conservaron durante 17 años por resiembra periódica en agar inclinado con fines de docencia en la salida terminal Farmacia Industrial de la licenciatura Química Farmacéutico Biológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; mismas que fueron utilizadas para el presente estudio empleando dos métodos de conservación a mediano plazo para determinar que se mantuvieran viables, puras y estables. El método de conservación por congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el que las células son suspendidas en un medio líquido que contenga un agente crioprotector (leche descremada al 10%) y conservación en medio sólido bajo una capa de aceite mineral, los cultivos se conservaron a temperatura ambiente. El periodo de estudio comprendió de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010, realizando un muestreo mensual tomando un inóculo hasta una dilución 1:40 000, de donde posteriormente se procedió a realizar conteo de esporas en cámara de Neubauer y resiembra en placas, procedimientos realizados para ambos métodos de conservación. Resultando el más adecuado el de congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ con porcentajes de supervivencia de las células superiores al 70% sin presentar contaminación ni cambios significativos en sus características macro y microscópica, cubriendo de esta manera los objetivos planteados para este trabajo y resultando una técnica factible para el laboratorio con fines de docencia.

INTRODUCCIÓN

Debido a las diferentes necesidades de la humanidad 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, licores), 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 otros. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los diferentes cultivos de microorganismos de manera que las propiedades de interés se conserven lo mejor posible.

Una tarea importante de los laboratorios de Microbiología es mantener y conservar las colecciones de microorganismos, asegurando a lo largo del tiempo todas las cepas viables sin cambios micro y macroscópicos observables, disponibles para las aplicaciones posteriores. Comúnmente los cultivos fúngicos que se utilizan en las prácticas de laboratorio de Microbiología, se mantienen por el método de transferencia periódica en agar inclinado, es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo y se reconoce como un método de conservación a corto plazo.

La conservación de cepas de microorganismos 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 monitoreo de las propiedades de las cepas, propician su empleo como inóculo confiable en la industria, la docencia y la investigación.

Tanto las colecciones estructuradas completamente 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 y conservación e información relacionada con las actividades de la colección, administración, manejo de datos, preparación de catálogos, entrenamientos, cursos, etc.

En la actualidad, las colecciones de cultivos para su conservación emplean la liofilización y la crioconservación, cuando se cuenta con los recursos necesarios, de lo contrario se emplean alternativas menos costosas, por tanto el presente trabajo tiene la finalidad de conformar un cepario de 24 cepas *Aspergillus niger* e implementar los dos métodos de conservación consisten en congelación a -40 °C en el que las células son suspendidas en un medio líquido que contenga un agente crioprotector (leche descremada) y conservación en medio sólido con una capa de aceite mineral almacenados a temperatura ambiente; 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 sean rentables y el material y equipo requerido se encuentren al alcance.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Aislamiento de microorganismos (hongos)

Métodos de muestreo y obtención de la muestra

Antes de iniciar un programa de aislamiento, es importante definir sus objetivos (producto de interés) para comprender la estructura del ecosistema donde se toman las muestras, esto ayudará a determinar los tipos de ambientes y 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.

Dentro de un mismo ecosistema, cepas genéticamente diferentes pueden coexistir dependiendo de qué planta o parte de planta se tome la muestra. La forma, tamaño de la muestra y condiciones de las superficies también pueden influir en la clasificación de los aislamientos. 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.

Los hongos son organismos heterótrofos ubicuos que ocupan casi todas partes como hábitat. Cualquier parte de una planta puede ser útil para el aislamiento de hongos (hoja, tallo, corteza, raíces y flores) y el tejido de la muestra influye en los tipos y números de los hongos aislados. Por ejemplo, los hongos que predominan en los peciolo de la hoja pueden ser encontrados menos frecuentemente en las puntas de las hojas y vice-versa. La edad y estado fisiológico de la muestra de planta usada, tiene influencia sobre los tipos de hongos aislados.¹

Elegida la fuente de aislamiento, las posibilidades de éxito dependen de la técnica elegida para el mismo; en este caso las alternativas son: a) aislamiento directo, o b) enriquecimiento del cultivo con o sin pretratamiento de la muestra.²

En cuanto a la forma de aislamiento de tales hongos es importante porque se ve reflejado al momento de la propagación.³

1.2. Tipos de aislamiento

1.2.1. 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 Ultra Violeta, 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.

1.2.2. 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.

1.3. Selección de microorganismos

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.

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.^{2, 4, 5, 6}

1.4. Colecciones de cultivos

Las colecciones de cultivos de microorganismos 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.⁷

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.⁸

La función básica de una colección de cultivos es la conservación, el almacenamiento y la distribución de los microorganismos, estas colecciones pueden almacenar bacterias, levaduras, hongos, actinomicetos y protozoarios. La necesidad de conservar y mantener estos microorganismos ha llevado a la formación de colecciones de cultivos en todo el mundo.^{9, 10}

1.5. Cultivos puros

Se entiende como la propagación de una célula única en cuanto a proveer material genéticamente uniforme en vez de una mezcla de este.³

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 se ven con lupa estereoscópica y con una aguja se toma el trozo de agar que contiene la espora y se transfiere al medio de cultivo.¹¹

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.¹²

1.6. 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.

1.7. Cepas de referencia certificadas

La cepa de referencia certificada 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. Asimismo, al tratarse de un material biológico puede darse dificultades de certificación.¹³

1.8. Conservación de los cultivos

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.⁶

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

- a) Conservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- b) Conservar los niveles de su productividad inicial.
- c) 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 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 conservación. La identidad del cultivo puede conocerse en 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.

En general los cultivos no son estudiados en detalle debido a la casi imposibilidad de determinar en cada etapa si ha habido 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. Los métodos de conservación o mantenimiento más importantes son los siguientes:

1.8.1. 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 2 meses.

Los inconvenientes que presenta son:

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

1.8.2. Mantenimiento bajo capa de aceite mineral

Es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos organismos 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.

1.8.3. Congelación

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

La técnica involucra el crecimiento del cultivo hasta la fase estacionaria, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las de fase exponencial.

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, amino ácidos, sales de ácidos orgánicos, proteínas, han sido también empleados.^{2, 14}

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. Dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso para obtener una máxima sobrevida.

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

En cuanto a la temperatura de conservación, la más baja recomendada es $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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.²

a) 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 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 debido a que 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 del microorganismo o antes de congelar. 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.^{5, 15}

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.^{5, 15, 16, 17, 18}

Tabla 1. Ejemplos de crioprotectores.

Alcoholes	Adonitol Etilenglicol: etanediol Glicerol Metanol Propilenglicol: 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 Polivinilpirrolidona
Azúcares	Glucosa 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

Los agentes crioprotectores modifican la tonicidad de las células interactuando en las velocidades de enfriamiento, de esta manera se disminuye el daño a proteínas y minimizan la congelación intracelular.¹⁴

Los crioprotectores pertenecen a dos tipos principales, definidas por las bases de su permeabilidad a la célula.^{19, 20}

(1) Agentes penetrantes. Los cuales en concentraciones altas protegen las células contra el daño de una congelación lenta, causado por los cristales de 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, trietilaminoacetato y etilenglicol.¹⁸

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.

(2) 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.

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.^{21, 22, 23}

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.¹⁹

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.²⁰

b) 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:

- a) Hacer una suspensión densa del microorganismo en el medio de congelación elegido utilizando un asa recta estéril.
- b) Dispensar de 1 a 1.5 mL de la suspensión en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales o criotubos) de 1.8 mL.
- c) Rotular el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.
- d) Colocar 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.
- e) Guardar la cepa a la temperatura elegida (-20 °C a -70 °C).
- f) Colocar el vial en una caja de almacenamiento con la tapa resistente al frío y hacer lo mismo con cada una de las cepas a conservar.
- g) Cuando desee recuperar el microorganismo a partir del vial, tenga en cuenta que la descongelación debe ser un proceso rápido.

Proceder de la siguiente forma:

- a) Sacar el vial de congelación. Tomar con un asa recta estéril una pequeña parte del material congelado con el fin de no descongelar todo el vial.
- b) Sembrar el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.
- c) Congelar inmediatamente el vial.²⁴

1.8.4. 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.

1.8.5. 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.

1.8.6. Liofilización

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la conservación 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.

Este método es apropiado 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, actinomicetos 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 ésta técnica 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.

1.8.7. 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. 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. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena.

De todos los métodos de conservación, 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.²

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%.^{2, 14}

1.9. Problemas de pérdida y degeneración de cepas

1.9.1. 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.

1.9.2. 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.

1.9.3. Infestación por ácaros

Son extremadamente pequeños. Estos transportan esporas y pueden ser traídos por el olor de algunas especies de hongos. Tienen la capacidad de cruzar el tapón de algodón de los cultivos puros. Si la infestación se extiende, los cultivos pueden contaminarse y perderse, además los cultivos aparentan estar puros sin embargo la contaminación puede estar presente.

1.9.4. Infestación por fagos

Se hacen diferencias entre virus relacionados con eucariontes y aquellos que infectan procariontes, estos últimos se denominan bacteriófagos. Los fagos pueden distinguirse por su modo de propagación. Los líticos producen numerosas copias de si mismos destruyendo a la célula huésped. Los moderados tienen la propiedad de entrar a un estado no lítico de profago, en el que la replicación del ácido nucleico está enlazada a la replicación del ADN de la célula huésped. Son difíciles de descubrir y es aun más difícil de librar de la infestación de fagos.²⁵

1.9.5. Mutación

Se define 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.^{7, 20}

La frecuencia de mutación se amplifica de modo notable con la exposición de las células a mutágenos como el caso de los rayos Ultra Violeta (UV) es un mutágeno físico que lesiona el ADN y durante la reposición 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 de las cadenas de este. Cuando los cambios en la población genética llegan a ocurrir en los cultivos, es imposible recuperar su forma original.²⁵

1.10. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza, son de estructura eucariótica, con núcleo que se reproducen por esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente y tienen estructuras somáticas filamentosas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas. Su talo es variable desde ameboide, Las colonias de hongos producen esporas, que permiten su dispersión y preservación. Las esporas germinarán en condiciones adecuadas para formar nuevas colonias.

Las colonias de los hongos pueden ser vistas en alimentos o frutos contaminados, en el campo. Los hongos producen una inmensa variedad de productos útiles para la industria y la medicina: vitaminas, sustitutos de plasma, anticancerígenos, aceleradores de la cicatrización, metabolitos secundarios, múltiples proteínas heterólogas, polisacáridos, ácidos orgánicos, entre otros.^{26, 27, 28,29}

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 por un proceso de meiosis (telemórfica) o asexual por mitosis (anamórfica). Los hongos unicelulares están representados por las levaduras y los multicelulares por los hongos filamentosos.^{26, 27, 28}

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. Pueden cultivarse con facilidad en medios de cultivos artificiales ya que sus requerimientos nutritivos son extraordinariamente simples. Los carbohidratos constituyen los componentes esenciales y son las biomoléculas más abundantes, la glucosa es el carbohidrato

más sencillo, su degradación proporciona a estos microorganismos la energía y el carbono necesarios para la biosíntesis de otros componentes esenciales. Su consumo y ruta metabólica dependerá del tipo de microorganismo y del medio en el cual se desarrolle.^{26, 27, 28,29}

1.10.1. 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.³⁰

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.²⁷

a) Morfología macroscópica

Se deben estudiar las siguientes características:

Forma y tamaño.

Color en la superficie o en el reverso.

Difusión del pigmento.

Coloración: blanca, rosada, gris, anaranjada, verde, rojiza, negra.

Textura: yesosa, terrosa, granulosa, vellosa, lanosa, cérea, cremosa.

Superficie: elevada o plana, levantamiento central.

Aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme.

Consistencia: dura, suave, firme, membranosa.

Velocidad de crecimiento.³⁰

b) Morfología microscópica

Es un estudio necesario que se hace a la hora de llevar a cabo una identificación fúngica.³¹

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. Colocándose el fragmento de la colonia con las agujas de disección y cubriendo 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.

d) Preparados con cinta adhesiva transparente

Este método suele ser útil debido a que la disposición de las esporas de los hongos filamentosos se conserva 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.⁹

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.³⁰

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.^{9, 10}

1.11. El género *Aspergillus*

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.

a) Morfología macro y microscópica

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 y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato.

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 (uniseriado o biseriado) como se observa en la Fig. 1 o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.³²

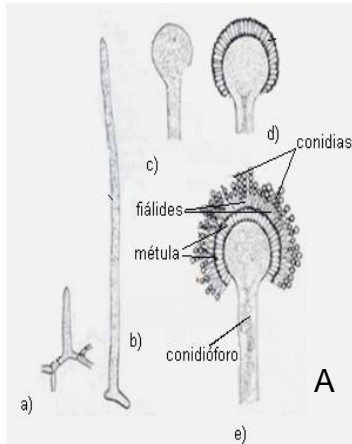
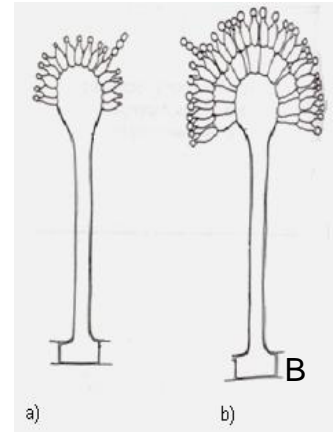


Figura 1. A. Desarrollo de conidios en *Aspergillus niger* a) Hifa; b) Conidióforo; c) Ápice del conidióforo; d) Métula; e) Fiálides con cadenas de conidios en fase de madurez.

B. Comparación de un *A. niger*: a) uniseriado y b) biseriado.



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 en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los grupos/secciones de *Aspergillus* (Klich & Pitt 1992, Kozakiewicz 1989).

Sección	Grupo	Conidios	Métula	Vesícula	Conidióforo
<i>Aspergilli</i>	<i>A. glaucus</i>	Verde, rugoso	No	Globosa a espatulada	Liso
<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	Blanco	Si	Globosa	Liso
<i>Cervini</i>	<i>A. cervinus</i>	Anaranjado	No	Globosa	Liso
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	Amarillo	Si	Globosa	Liso o rugoso
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	Verde claro	No	Claviforme	Liso
<i>Cremeri</i>	<i>A. cremeoflavus</i>	Verde pardo	Si/no	Globosa	Liso
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	Canela	Si	Espatulada	Liso
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Verde pardo	Si/no	Globosa	Rugoso
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	Verde azulado	No	Espatulada	Liso
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	Verde oscuro	Si	Espatulada	Liso, pardo
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	Negro	Si/no	Globosa	Liso
<i>Ornati</i>	<i>A. ornatulus</i>	Aceituna, verde amarillento	No	Espatulada	Liso
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	verde oscuro forma de tonel	No	Piriforme	Liso
<i>Sparsi</i>	<i>A. sparsus</i>	Aceituna pardo	Si	Globosa a piriforme	Rugoso
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	Canela pardo	Si	Globosa	Liso
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	gris aceituna	Si	Oval	Liso
<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	Verde	Si	Variable	Liso
<i>Wentii</i>	<i>A. wentii</i>	Beige	Si	Variable	Liso a rugoso

Tomado de: Carrillo L, 2003.

b) 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.³³

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.

El volumen de medio vaciado en la caja de Petri influye sobre el diámetro de las colonias y otras características macroscópicas por ejemplo, en Czapek-Levadura, un espesor mayor hace que *A. flavus* produzca más esclerocios y el reverso de la colonia sea más oscuro mientras *A. terreus* esporula menos.

Un volumen mayor de Malta-Glucosa mejora el crecimiento micelial de *A. terreus* y *A. versicolor* en detrimento de la esporulación. Algunas de las razones para tal comportamiento son una mayor disponibilidad de nutrientes y un cambio más lento en la actividad del agua o el pH.

Con el fin de comprobar que los medios utilizados son adecuados para observar la velocidad de crecimiento y las características macro y microscópicas, 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 los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se los mantiene durante mucho tiempo mediante sucesivas picaduras. Una manera de recuperarlos es cultivarlos en trozos de chilacayote estériles u otros frutos. La temperatura de transporte del material amohosado al laboratorio y mantenido antes de su análisis, puede influir en la biota aislada a continuación. Por otra parte, sobre los materiales con baja actividad de agua será más frecuente el aislamiento de *Aspergillus*.³²

c) Fisiología

La ubicuidad de los aspergilos 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 0-5 °C para *A. glaucus* hasta 50-55 °C para *A. fumigatus*, estando el óptimo entre 30-33 °C para la mayoría de las especies. La Figura 1 muestra el efecto del pH del medio y la temperatura de incubación sobre la velocidad de crecimiento radial de *A. flavus*.

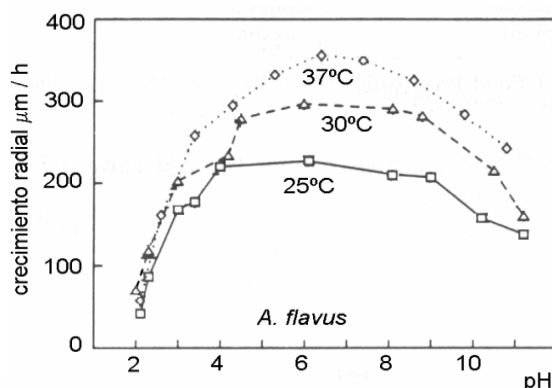


Figura 2. Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento radial en el microorganismo *A. flavus*.

En la tabla 3 se observan los valores de temperatura y actividad de agua para el crecimiento de algunas especies de aspergilos.

Tabla 3. Temperatura y actividad de agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de *Aspergillus* y *Eurotium*.

Especies	Temperatura °C		Actividad de agua	
	Rango	Óptimo	Mínimo	Óptimo
<i>A. flavus</i> ,	6-45	35-37	0,78	0,98
<i>A. candidus</i>	3-44	25-32	0,75	0,90-0,98
<i>A. fumigatus</i>	10-55	40-42	0,85	0,98-0,99
<i>A. restrictus</i>	9-40	30	0,71	0,96
<i>A. versicolor</i>	4-39	25-30	0,78	0,95
<i>E.amstelodami</i>	5-46	33-35	0,71-0,73	0,93-0,96
<i>E. chevalieri</i>	5-43	30-35	0,71	0,93-0,95
<i>E. repens</i>	7-40	25-27	0,75	0,93-0,95
<i>E. rubrum</i>	5-40	25-27	0,70	0,93

Tomado de: Carrillo L, 2003.

Algunos hongos pueden crecer a actividades del agua tan bajas como 0.60 a 0.70. Las esporas de hongos resisten más a la desecación, esta resistencia prolonga la supervivencia de los microorganismos que son dispersados en el ambiente. Una célula seca es metabólicamente durmiente, está en estado de latencia, y en ausencia de calor u otros factores externos puede permanecer en este estado (pero viable) durante largos periodos de tiempo y revivir rápidamente con la introducción de humedad.

La Fig. 2 muestra que el crecimiento óptimo para diversas especies de *Aspergillus* ocurre en un medio en el cual la actividad del agua es menor a 1.^{3, 34}

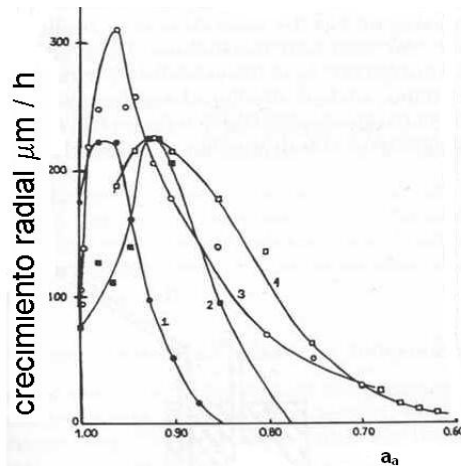


Figura 3. Influencia de la actividad del agua (a_a) sobre el crecimiento radial ($\mu\text{m/h}$) de hongos filamentosos (1) *A. niger* en 20 °C; (2) *A. glaucus* en 20 °C; (3) *A. amstelodami* en 25 °C; (4) *Xeromyces bisporus* en 25 °C.

Tabla 4. El color de la colonia en diversas especies de *Aspergillus*

Especies	Superficie	Reverso
<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	color 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

Tomado de: Microbiología General I, FES Zaragoza, UNAM, microbiologia1.blogspot.com.³⁵

d) Importancia industrial del género

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.

En este caso el microorganismo *A. niger* ha recobrado importancia en el campo de la industria por su producción de enzimas y ácidos primordialmente, como se muestra en las tablas.

Tabla 5. Algunos ácidos de importancia producidos por especies de *Aspergillus*.

Cepa	Glucónico (g/L)	Málico (g/L)	Cítrico (g/L)	Succínico (g/L)
<i>A. niger</i> 1	67	14	4	0

<i>A.niger</i> 2	62	4	5	0
<i>A.niger</i> 3	48	4	3	0
<i>A.niger</i> 4	23	3	5	0
<i>A. flavus</i>		39		13
<i>A orizae</i>	8	35		6
<i>A. sojae</i>		30		3
<i>A.ochraceus</i>		17		
<i>A. foetidus</i>		11	8	
<i>A. nidulans</i>		8		3
<i>A.aculeatus</i>		3	17	

Tomado de Bercovitz A., Peleg Y., Battat Roken JS and Golbert I. *App. Environm. Microbiol.*1990; 56, 1594-1597.

Tabla 6. Algunas enzimas de importancia industrial producidas por especies de *Aspergillus*

Enzima	Microorganismo
α -Amilasa	<i>A. orizae</i>
Amiloglucosidasa	<i>A. niger</i>
Glucosa deshidrogenasa	<i>A. sp</i>
β -Glucosidasa	<i>A. niger</i>
β -Gluconasa	<i>A. sp</i>
β -Galactosidasa	<i>A. niger</i>
Lipasa	<i>A. niger</i>
Pectinasa	<i>A. niger</i>
Metaloproteinasa	<i>A. niger</i>
Catalasa	<i>A. niger</i>

Tomado de Smith JE. 1994³⁴

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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 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 plantea la conformación de un cepario utilizando dos métodos de conservación a mediano plazo.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Conformar un cepario empleando 24 cepas de *Aspergillus niger* evaluando los métodos de conservación por congelación y mantenimiento bajo capa de aceite mineral a temperatura ambiente, con el fin de conservarlas puras, estables y viables garantizando la supervivencia del 70 % de las células por un período de tiempo aceptable, de tal forma que las especies fúngicas no pierdan su originalidad.

Objetivos particulares

- Búsqueda de las fechas y fuentes de aislamiento de las cepas de *A. niger*.
- Asignación de claves a cada cepa.
- Mantenimiento y resiembra en agar inclinado.
- Realización de microcultivos y tinciones.
- Conservación con capa de aceite mineral a temperatura ambiente.
- Conservación en congelación a -40 °C.
- Muestreo mensual para garantizar viabilidad, estabilidad y pureza de las cepas de *A. niger*.

IV. HIPÓTESIS

Si se emplean los métodos de conservación: congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y recubrimiento bajo capa de aceite mineral a temperatura ambiente se podrán mantener las cepas fúngicas viables, puras y estables, evaluando cada mes estos factores de respuesta, durante el tiempo de almacenamiento se espera que no presenten cambios significativos.

V. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

A. TIPO DE ESTUDIO

Restrospectivo, longitudinal, descriptivo y experimental.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas de *Aspergillus niger* aisladas de diferentes fuentes en la práctica "Aislamiento de microorganismos productores de ácidos orgánicos" del módulo Microbiología Farmacéutica que se imparte en el noveno semestre de la carrera de Química Farmacéutica Biológica salida terminal Farmacia Industrial, durante el periodo de 1992-2008.

C. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cepas de *Aspergillus niger* puras
- Criotubos estériles de la misma capacidad
- Temperatura constante
- Suspensión celular uniforme

D. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cepas contaminadas
- Criotubos en mal estado
- Material no estéril

E. VARIABLES

Temperatura

Medio de conservación

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. MATERIALES

a) MATERIAL

Tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapa de baquelita

Tubos de ensaye de 22 x 175 mm con tapa de baquelita

Tubos de ensaye de 15 x 120 mm

Criotubos de 1.8 mL

Matraces Erlenmeyer de 1000 mL, 500 mL

Mecheros

Gradillas

Pipetas graduadas de 0.5, 1 y 10 mL

Perlas de vidrio de 2 mm de diámetro

Portaobjetos

Cubreobjetos

Papel filtro
 Triángulos de vidrio
 Cajas Petri Pyrex de 100 x 15 mm
 Cajas Petri Pyrex de 150 x 20 mm
 Asas bacteriológicas rectas
 Cámara de Neubauer
 Varillas de vidrio punta roma
 Puntas para micropipeta
 Pipeta automática 5-50 µL

b) MATERIAL BIOLÓGICO

<i>Aspergillus niger</i> CEPA	ATCC 20107 FUENTE DE AISLAMIENTO
<i>Aspergillus niger</i>	Tierra 1
<i>Aspergillus niger</i>	Tierra 2
<i>Aspergillus niger</i>	Suelo 2
<i>Aspergillus niger</i>	Suelo 3
<i>Aspergillus niger</i>	Limón
<i>Aspergillus niger</i>	Limón B
<i>Aspergillus niger</i>	Limón C
<i>Aspergillus niger</i>	Limón D
<i>Aspergillus niger</i>	Naranja
<i>Aspergillus niger</i>	Cebolla
<i>Aspergillus niger</i>	Agar Sangre
<i>Aspergillus niger</i>	Melón
<i>Aspergillus niger</i>	Cerveza
<i>Aspergillus niger</i>	Masa
<i>Aspergillus niger</i>	Toronja
<i>Aspergillus niger</i>	Almíbar
<i>Aspergillus niger</i>	Bioterio
<i>Aspergillus niger</i>	Producción
<i>Aspergillus niger</i>	Durazno
<i>Aspergillus niger</i>	Papaya
<i>Aspergillus niger</i>	Granada
<i>Aspergillus niger</i>	Guayaba 1
<i>Aspergillus niger</i>	Guayaba 2

c) EQUIPOS

Balanza granataria
 Congelador a -40 °C
 Incubadora a 25 °C
 Microscopio óptico
 Autoclave
 Refrigerador 4 °C

d) MEDIOS DE CULTIVO

Agar Sabouraud
Medio OGG (Oxitetraciclina Glucosa Gentamicina Extracto de Levadura)
Agar Papa Dextrosa

e) REACTIVOS

Agua destilada
Aceite mineral
Leche desnatada al 10%
Glicerina
Formaldehído al 10%
Xilol
Acetona
Resina
Etanol al 96%
Acido acético

f) ANTIBIÓTICOS

Gentamicina inyectable
Oxitetraciclina inyectable

g) COLORANTES

Azul de algodón acético
Eritrocina
Azul de Evans

2. MÉTODOS

a) RESIEMBRA DE CULTIVOS

Agar Dextrosa Sabouraud (DSA)

Método de preparación:

Suspender 65 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitando el sobrecalentamiento. Verter en tubos de ensaye 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 y dejar enfriar los tubos.

Procedimiento:

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

b) MICROCULTIVO

1. El trabajo se realiza en condiciones de esterilidad mediante el uso de mecheros.
2. Cortar un cilindro de agar PDA de un centímetro de diámetro, con un grosor de aproximadamente 0.3 cm.
3. En la caja Petri estéril, colocar en la base de la caja un triángulo de vidrio, sobre él un portaobjeto de 76 x 26 mm en el que se depositan dos cilindros de agar PDA separados 2,5 cm aproximadamente entre sí, se realiza esta operación utilizando una espátula estéril.
4. Inocular los bordes del cilindro de agar PDA en cuatro lugares con una pequeña porción de las colonias de las 24 cepas a estudiar, mediante un asa recta o la punta de una aguja de disección.
5. Colocar el otro portaobjeto de inmediato sobre el trozo de agar PDA inoculado.
6. Al término de esta serie de operaciones, depositar aproximadamente 5 mL de glicerina-agua en la base de la caja petri sin rebasar el nivel del triángulo de vidrio, tapar la caja e incubar a una temperatura de 30 °C de 3-7 días, hasta un tiempo en el cual la maduración fuera evidente en la coloración y abundancia de esporas.
7. Cuando el desarrollo es de $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del portaobjetos se retira la glicerina y se adiciona un volumen equivalente de formaldehído al 10% durante 30 min.
8. Después extraer del portaobjetos los cilindros de agar PDA. Esta operación se realiza sobre un recipiente con fenol al 5%, sobre el cual se dejan caer los cilindros.
9. Las preparaciones se conservan para el teñido y estudios adicionales.

c) TINCIONES

C.1. Tinción con azul de algodón acético

C.1.1 Azul de algodón	0.5 g
Ácido acético	3 mL
Agua destilada	97 mL

Para un volumen de 100 mL: disolver el azul de algodón en ácido acético posteriormente adicionar el agua destilada.

Método:

- Fijar la preparación con metanol durante 10 min.
- Colocar el colorante a baño maría y realizar la tinción de las preparaciones por 15 minutos calentando hasta emisión de vapores.
- Lavar ligeramente con agua de la llave.
- Pasar por etanol al 96% y secar.
- Lavar con etanol absoluto.
- Montar la laminilla: colocar una gota de xilol, seguida de una de resina, colocar un cubreobjetos encima y con ayuda de la goma de un lápiz presionar para eliminar las burbujas que se forman. Dejar secar para eliminar el exceso. Conservar para ser observados al microscopio.

C.2. Tinción con eritrocina

C.2.1 Eritrocina	2 g
Alcohol etílico	2 mL
Agua destilada	97 mL

Para un volumen de 100 mL: disolver la eritrocina en alcohol etílico posteriormente adicionar el agua destilada.

Método:

- Fijar con metanol por 10-15 min.
- Colocar el colorante a baño maría y llevar a cabo la tinción de las preparaciones durante 15 min.
- Retirar el exceso de colorante con etanol al 96% y dejar secar.
- Colocar en acetona durante 10 min.
- Colocar en baño de xilol- acetona (1:2) durante 10 min y dejar secar.
- Montar las laminillas.

d) CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN A -40 °C

(1) Preparación del soporte (Leche descremada)

- a) Disolver 10 g del medio deshidratado en 100 mL de agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- b) Tener cuidado en evitar sobre calentamiento o que la leche tome un color caramelo ya que de esta manera no conservará los microorganismos. La duración del medio es de 2 meses. El pH del medio debe mantenerse en 6.1 ± 0.2 .

(2) Suspensión celular

- a) Lavar dos veces las perlas, primero con agua de la llave y la segunda con agua destilada, seguido de un secado a 45 °C. Aproximadamente 20-30 perlas de vidrio preparadas se introducen en criotubos estériles con capacidad de 1.8 mL cada uno.
- b) 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. Rotular el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección. Colocar en una caja de almacenamiento con la tapa resistente al frío, continuar sucesivamente lo mismo con cada una de las cepas a conservar. Guardar la cepa a la temperatura elegida (-40°C).

e) CONSERVACIÓN EN CAPA DE ACEITE MINERAL

Al observar que las cepas presentan abundante esporulación y en condiciones asépticas, verter el aceite mineral estéril en cada una de las cepas, el cual debe cubrir todo el cultivo, de tal manera que el cultivo permanece 1 cm por debajo del borde del tapón de rosca. Cerrar el tubo y conservar a temperatura ambiente.

f) VIABILIDAD DEL HONGO

Conteo de colonias de hongos

Medio OGG (Agar Oxitetraciclina Gentamicina Glucosa Extracto de Levadura).

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Método de preparación:

Colocar los ingredientes en agua durante 15 minutos, calentar hasta ebullición para disolver completamente y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C (15 lb de presión). Enfriar hasta aproximadamente 50 °C, añadir 100 mL de una solución de 1 mg/mL de Oxitetraciclina y 50 mL de una solución de 1 mg/mL de Gentamicina.

Verter 100 mL aproximadamente en cada caja de 150 x 20 mm.

Formulación de Agar blando (0.7%)

Agar	2.1 g
Caldo Sabouraud	9.0 g
Agua destilada	300 mL

Para un volumen total de 300 mL. Disolver los ingredientes y adicionar 10 mL en tubos de ensayo de 15 x 20 mm con tapón de gasa y algodón, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min. Mantenerlos en baño María a 40 °C.

Técnica:

Tomar alícuotas de 0.005 mL de muestra de la dilución última (1:40000) a la que no se le adicionó colorante, se deposita en agar blando al 0.7% (ver preparación de agar blando) a una temperatura de 40 °C. Agitar en vórtex para homogeneizar. Verter la muestra y extender el inóculo sobre la superficie del medio OGG. Incubar las cajas sembradas durante 5 días a temperatura ambiente. Observar el crecimiento a partir de los 2 días de incubación. Es importante que las colonias mantengan una separación adecuada para ser efectuado el conteo sin problema alguno. Calcular el número de unidades propagadas de mohos por mL.

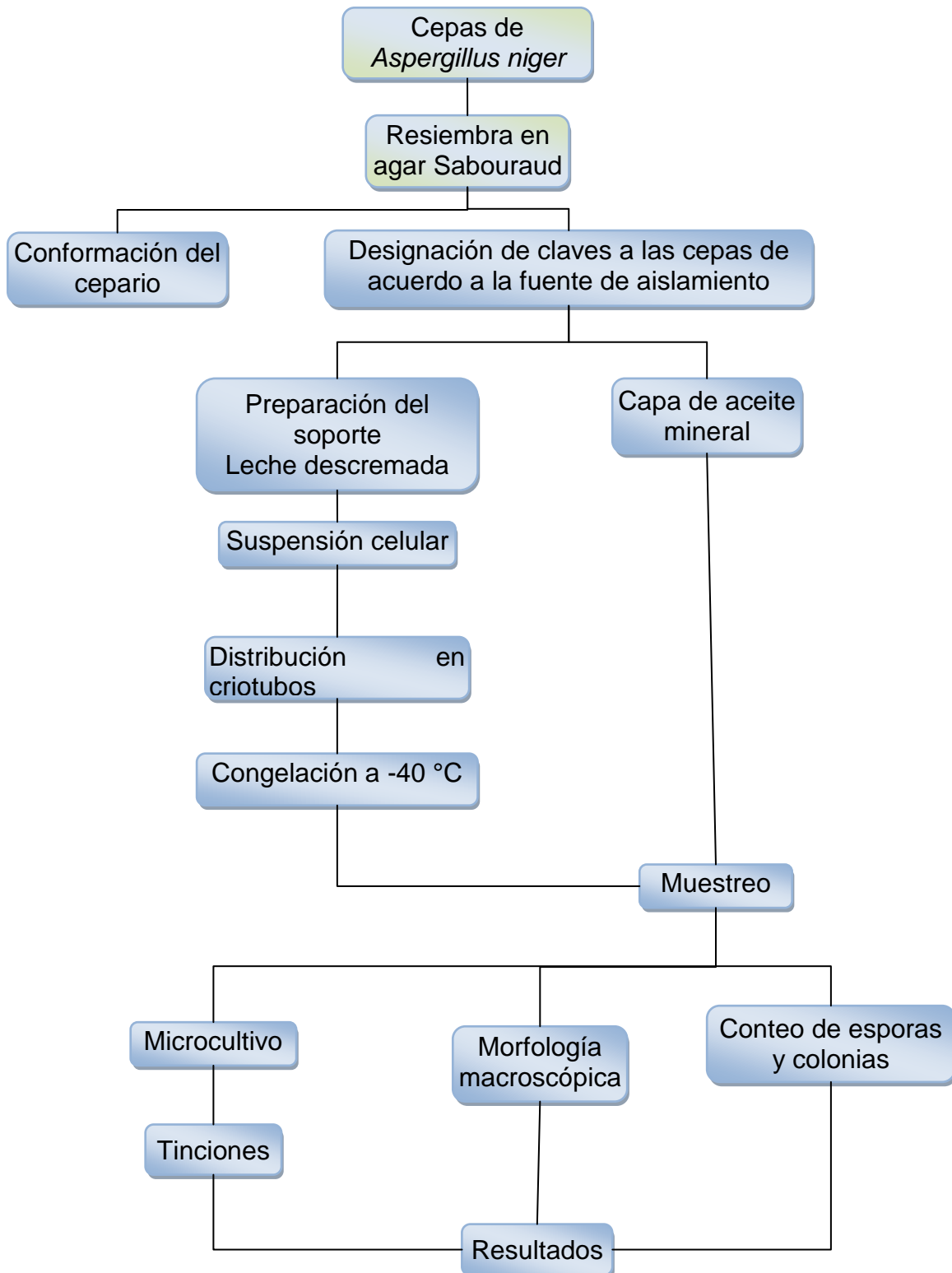
g) CONTEO DE ESPORAS

Preparación de tubos para el conteo de esporas

Colocar volúmenes de 1 mL y 0.5 mL de agua destilada en tubos de 13 x 100 mm con tapa de baquelita haciendo un duplicado de estos últimos (de los cuales a uno se le adiciona el Azul de Evans para teñir las esporas y facilitar su conteo en el microscopio). Los tubos que no contienen colorante se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Hacer una suspensión de esporas con 0.1 mL de la muestra en un 1 mL de agua estéril, se realizan diluciones (1:20), realizar el conteo en la cámara de Neubauer.

3. DIAGRAMA DE FLUJO



VII. RESULTADOS

A. ASIGNACION DE CLAVES

A cada cepa se le asignó una clave⁴⁰:

MF-H-1

MF: Microbiología Farmacéutica

H: hongo

1: número distintivo de acuerdo a la cronología del aislamiento

Clave asignada	Tipo de cepa	Año de adquisición
MF-H-1	ATTC 20107	1991

Clave asignada	Fuente de aislamiento	Año de aislamiento
MF-H-2	Limón	1991
MF-H-3	Tierra 1	1991
MF-H-4	Limón B	1993
MF-H-5	Naranja	1993
MF-H-6	Guayaba 1	1993
MF-H-7	Guayaba 2	1993
MF-H-8	Producción	1993
MF-H-9	Toronja	1993
MF-H-10	Cebolla	1996
MF-H-11	Masa	1996
MF-H-12	Cerveza	1996
MF-H-13	Limón C	2003
MF-H-14	Limón D	2003
MF-H-15	Agar Sangre	2003
MF-H-16	Bioterio	2003
MF-H-17	Suelo 2	2003
MF-H-18	Suelo 3	2003
MF-H-19	Durazno	2003
MF-H-20	Melón	2003
MF-H-21	Almíbar	2005
MF-H-22	Tierra 2	2008
MF-H-23	Papaya	2008
MF-H-24	Granada	2008

Tabla 1. Cepario conformado de *Aspergillus niger*

Cada cepa se resembró en el medio DSA, conservándose a temperatura ambiente.

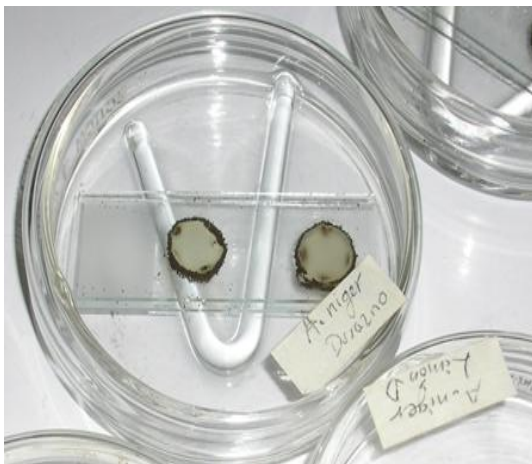
B. RESIEMBRA EN TUBOS CON AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Se realizó la resiembra en este medio para posteriormente madurar y conservarse en capa de aceite mineral previamente esterilizado y colocar finalmente el tapón de baquelita.



Fig. 1. Cepas de *A.niger* antes de ser colocados bajo capa de aceite mineral.

C. MICROCULTIVO



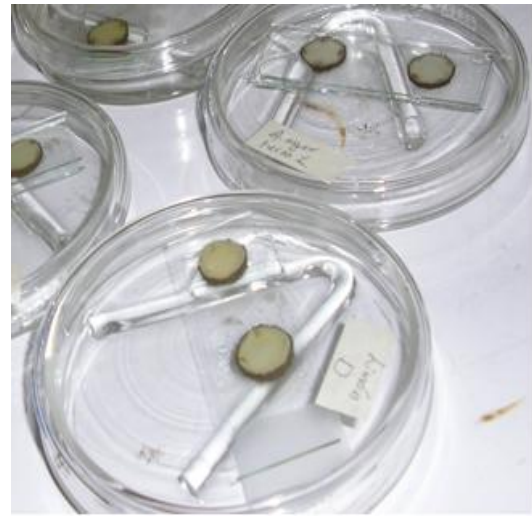


Fig. 2. Microcultivo de *A. niger* en condiciones óptimas para realizar tinción.

1. TINCION DE MICROCULTIVOS

Tinción de microcultivos con Azul de de Algodón Acético



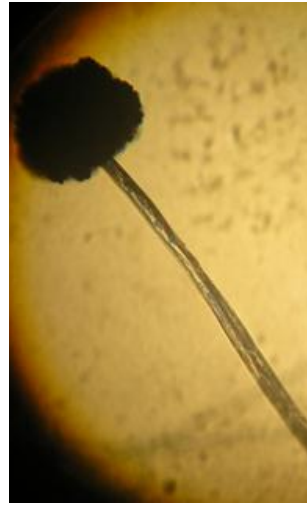
a) *A. niger* MF-H-23



b) *A. niger* MF-H-3



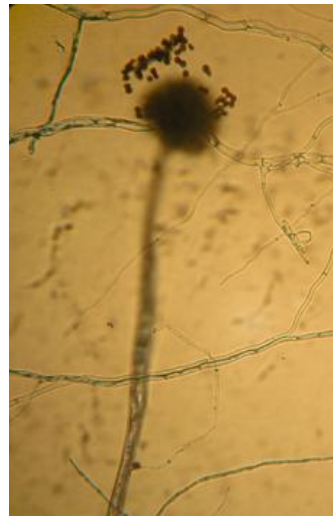
c) *A. niger* MF-H-24



d) *A. niger* MF-H-6



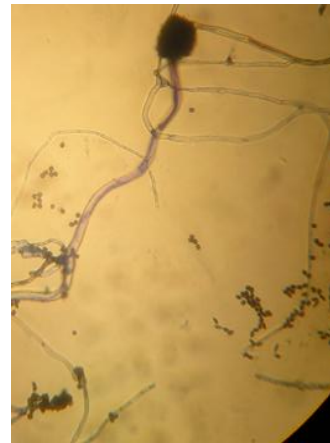
e) *A. niger* MF-H-21



f) *A. niger* MF-H-9



g) *A. niger* MF-H-8



h) *A. niger* MF-H-16



i) *A. niger* MF-H-14



j) *A. niger* MF-H-19



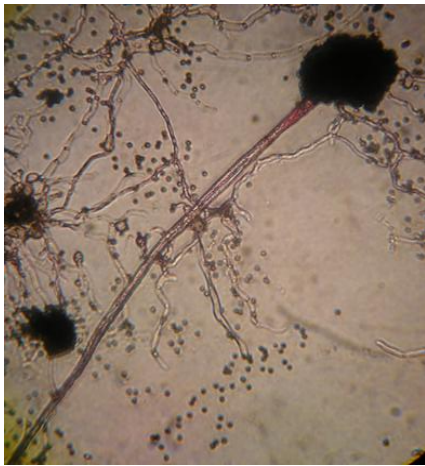
k) *A. niger* MF-H-12



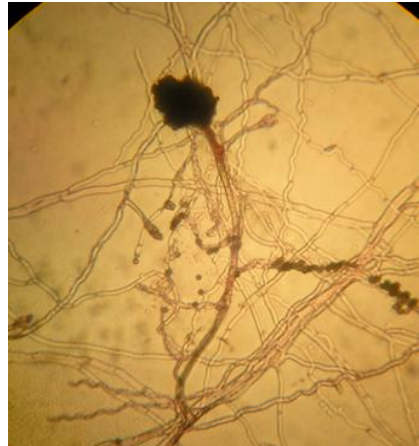
l) *A. niger* MF-H-1

Fig. 3. Imágenes de las diferentes cepas donde se observan morfología microscópica de *A. niger* después de ser teñidas con Azul de de Algodón Acético

Tinción de microcultivos con Eritrocina



a) *A. niger* MF-H-23



b) *A. niger* MF-H-6



c) *A. niger* MF-H-10



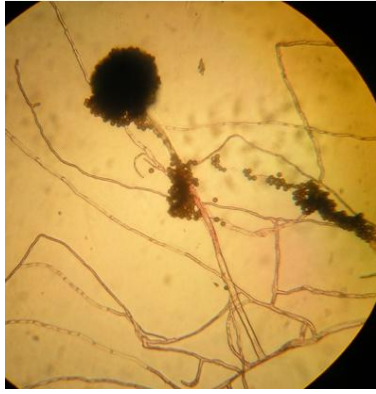
d) *A. niger* MF-H-15



e) *A. niger* MF-H-13



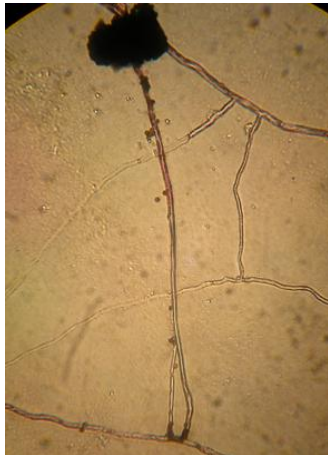
f) *A. niger* MF-H-16



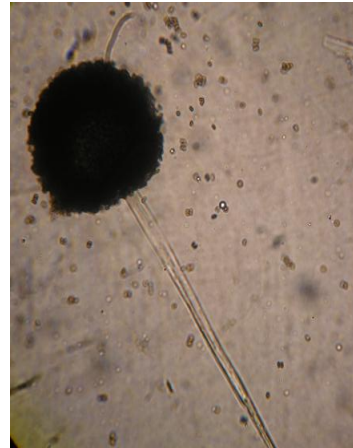
g) *A. niger* MF-H-8



h) *A. niger* MF-H-5



i) *A. niger* MF-H-18-



j) *A. niger* MF-H-17



k) *A. niger* MF-H-14



l) *A. niger* MF-H-9

Fig. 4. Imágenes de las diferentes cepas donde se observan morfología microscópica de *A. niger* después de ser teñidas con Eritrocina.

D. VIABILIDAD

Conteo de colonias en cajas de OGG para verificar la viabilidad

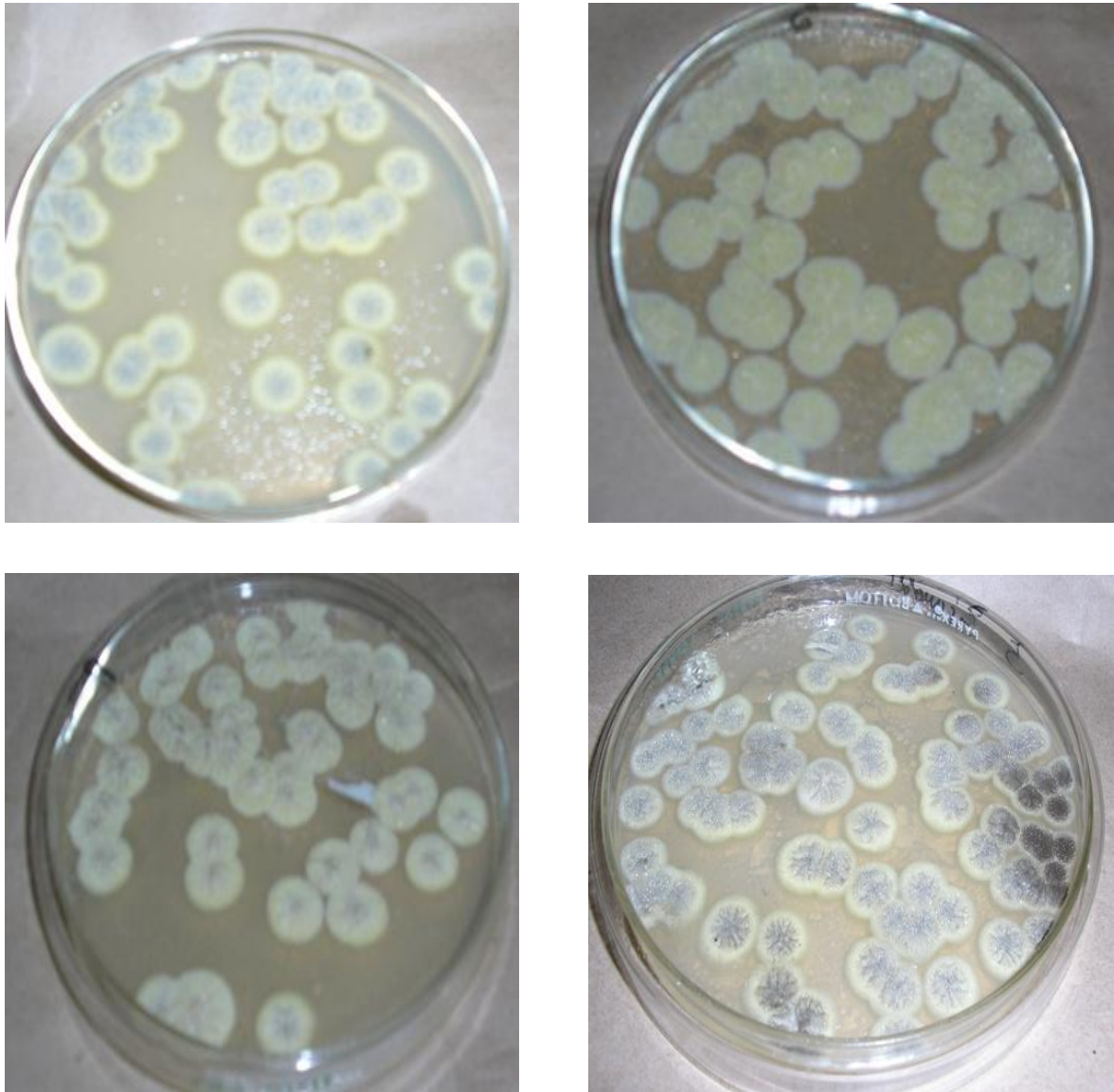


Fig. 5. Imágenes del conteo de colonias y morfología macroscópica de *A.niger* en cajas de OGG.

E. CONTEO DE ESPORAS

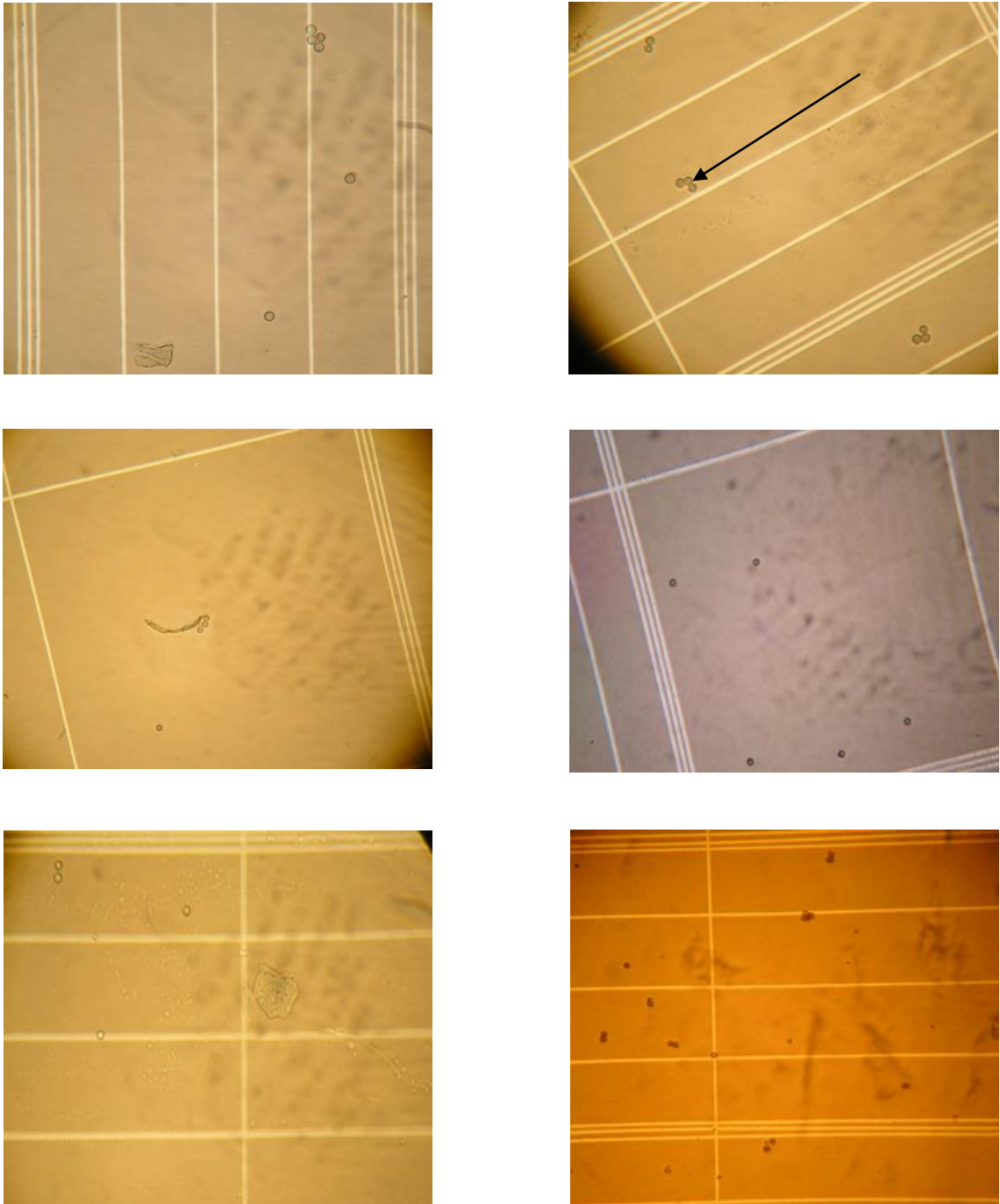


Figura 6. Imágenes del conteo de esporas de *A.niger* en algunos de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.

F. RESULTADOS DE VIABILIDAD

En la tabla 2 se presentan los resultados del porcentaje del conteo de esporas en cámara de Neubauer, observándose un descenso en las cepas conservadas bajo capa de aceite mineral almacenadas a temperatura ambiente.

Los resultados de la tabla 3 muestran un descenso en la viabilidad de las cepas conservadas bajo capa de aceite mineral almacenados a temperatura ambiente.

La tabla 4 muestra los resultados para el método de congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ que se mantienen los porcentajes por arriba del 70% en el conteo de esporas realizado en la cámara de Neubauer. Mientras que en la tabla 5 se observa que los porcentajes de esporas viables para el método de congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ se mantienen superiores al 80%.

Tabla 2. Porcentaje del conteo de esporas de las cepas conservadas con capa de aceite mineral a temperatura ambiente (# de esporas/mL) durante el periodo de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010

Cepa	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
1	100	93.751	103.125	73.1575	65.387	0
2	100	106.5798	94.7368	70.4836	65.251	0
3	100	104.35	73.2673	65.4603	62.7522	0
4	100	96.8253	76.9841	68.120	62.7528	0
5	100	108.3333	84.375	46.875	56.3333	0
6	100	73.3944	103.6697	70.9655	68	0
7	100	88.1578	105.2631	70.4816	67.6873	0
8	100	107.4074	75.3086	56.8460	51.1267	0
9	100	77.7777	104.2735	75.9358	68.6666	0
10	100	93.4762	73.9130	76.9117	72.1265	0
11	100	98.8636	95.4545	59.7203	62.6363	0
12	100	96.2025	107.5949	56.3259	86.8101	0
13	100	88.7096	99.1935	69.7741	69.9677	0
14	100	88.3116	87.0129	74.0259	62.0500	0
15	100	81.6513	105.5045	80.3113	58.450	0
16	100	86.2068	106.8965	80.1472	67.9565	0
17	100	93.3333	98.0952	73.8257	68.2538	0
18	100	89.9441	85.4748	80.4847	61.8412	0
19	100	87.2340	64.8936	62.6849	60	0
20	100	103.8461	75	75	60.5976	0
21	100	105.6603	96.2264	84.9690	65.4925	0
22	100	88.3495	73.7864	70.4786	59.1194	0
23	100	91.5032	84.9673	82.9368	65.13	0
24	100	109.0909	71.0743	65.5768	60.9890	0

Tabla 3. Porcentaje del conteo de esporas viables conservadas con capa de aceite mineral a temperatura ambiente (# de esporas viables/mL) durante el periodo de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010

Cepa	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
1	100	96.6428	78.3135	58.4712	42.8642	0
2	100	90.625	126.5100	76.512	32.537	0
3	100	134.7826	108.9100	60.8318	35	0
4	100	76.7123	70.7602	43.4205	38	0
5	100	94.9152	74	50.2045	52	0
6	100	84.5070	69.5422	61.8272	44.8478	0
7	100	82.5	125.7123	55	40.25	0
8	100	106.5217	96.2780	54.6502	46	0
9	100	80.2816	105.0222	70.9830	47.0507	0
10	100	86.7924	77.2245	71.5849	50.3349	0
11	100	98	89.3512	48	43	0
12	100	97.9166	76	37.3583	35.7	0
13	100	79.0322	86.8967	51.8225	51.6129	0
14	100	93.5897	85.4130	64.6834	48	0
15	100	88.8888	70.2222	39.7740	48	0
16	100	66.0714	61.7142	56	58.2714	0
17	100	75.4098	88.2588	45.1622	71.7704	0
18	100	104.8192	89.3614	65	74.9349	0
19	100	98.0769	97.0769	45.2307	66.3584	0
20	100	90.1408	83.0570	39.0584	56.4764	0
21	100	93.5483	52.3887	60.0293	65.9741	0
22	100	70.7272	87.9339	67.6767	48	0
23	100	105.7471	96.7517	64.4444	50.1274	0
24	100	96.8295	70.7413	60.6600	40	0

Tabla 4. Porcentaje del conteo de esporas conservadas por la técnica de congelación a -40 °C (# de esporas/mL) durante el periodo de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010

Cepa	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
1	100	91.7647	98.2353	102.9412	93.5294	100
2	100	106.0241	98.7952	103.6145	91.5683	96.3855
3	100	111.3636	97.7273	104.5455	93.1878	91.1191
4	100	104.76	98.4127	96.8254	95.2381	93.6505
5	100	93.1818	90.9091	97.7273	95.4545	104
6	100	91.1667	87.5	95.8383	91.6667	83.3333
7	100	94.9153	93.2203	101.6949	96.6102	106.7797
8	100	94.5946	89.1892	94.5946	86.4865	83.7838
9	100	97.7778	88.8889	113.3333	111.1111	91.1111
10	100	105.7471	98.8506	104.5977	95.4023	107
11	100	103.5714	89.2857	97.3214	101.7857	98.2143
12	100	98.6111	98.6111	95.8333	105.5556	94.4444
13	100	93.2886	92.6174	104.0268	102.6846	91.9463
14	100	93.8462	93.0769	90.7692	97.6923	94.6154
15	100	92.5170	97.2789	104.0816	97.9592	106.8027
16	100	102.4390	94.3089	99.1870	103.2520	95.1220
17	100	106.7568	94.5946	98.6486	104.0541	93.2432
18	100	98.3333	102.5	98.3333	95.8333	100.8333
19	100	101.8182	94.5455	98.1818	103.6364	90.9091
20	100	109.2593	94.4444	101.8519	92.5926	105.5565
21	100	92.2481	96.8992	99.2248	102.3256	93.0233
22	100	104.5139	92.0139	93.4028	94.7917	104.1667
23	100	97.3451	98.2301	100.5900	94.6903	92.0354
24	100	103.9648	102.2026	95.5947	93.8326	92.5110

Tabla 5. Porcentaje del conteo de esporas viables conservadas por la técnica de congelación a -40 °C(# de esporas viables/mL) durante el periodo de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010

Cepa	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
1	100	90.9091	103.3303	98.9898	119.1919	106.0606
2	100	93.4783	108.6956	91.3043	108.6956	115.2173
3	100	95.4545	90.9090	104.5454	113.6363	90.9090
4	100	90.9091	103.0303	93.9393	118.1818	112.1212
5	100	94.7368	110.5263	89.4736	115.7894	105.2631
6	100	94.4444	97.2222	91.6666	105.5555	111.1111
7	100	93.75	90.625	90.625	104	93.75
8	100	88.2353	105.8823	88.2352	117.6470	94.1176
9	100	101.3158	103.9473	98.6842	102.6315	88.1578
10	100	91	88.8888	95.5555	104.4444	111.1111
11	100	89.2857	101.7857	92.8571	106	80.3571
12	100	95.1218	102.5641	89.7435	110.2564	117.9487
13	100	90.9645	97	99.1236	94.6808	93.6170
14	100	102.9412	98.5294	110.2941	97.0588	115
15	100	102	97.3684	92.1052	88.2001	101.3157
16	100	94.2029	97.4101	103	105.8004	107.2463
17	100	92.1053	97.3684	105.2631	92.1052	107.8947
18	100	102	101.3888	97.2222	102.7777	108.3333
19	100	87.0968	103.2258	106.4516	113	96.7741
20	100	107	93.1034	103.4482	86.2068	105.8965
21	100	105.0633	113	111.3924	112.6582	102
22	100	93.5484	96.1774	101.2903	96.7741	96.7741
23	100	94.6809	95.7446	101.0638	97.8723	93.2721
24	100	96.063	101.5748	98.4519	94.4881	102

Las Fig. 7, 8 y 9, muestran por el método de crioconservación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ que la viabilidad permanece constante mientras que el de conservación con capa de aceite mineral presenta un significativo descenso conforme transcurre el tiempo.

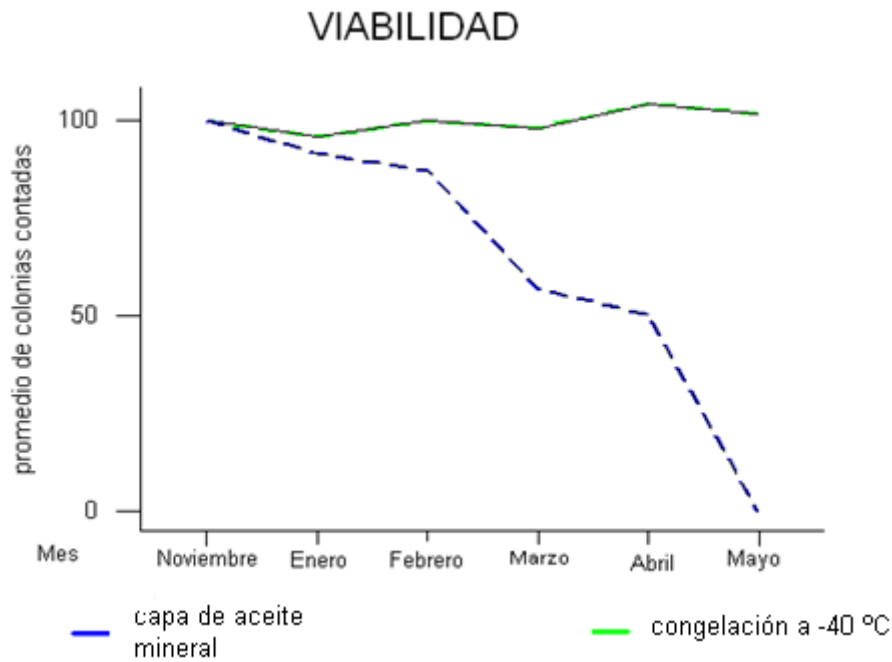


Fig. 7. Gráfica de conteo de colonias de *A.niger* en los dos métodos de conservación realizados.

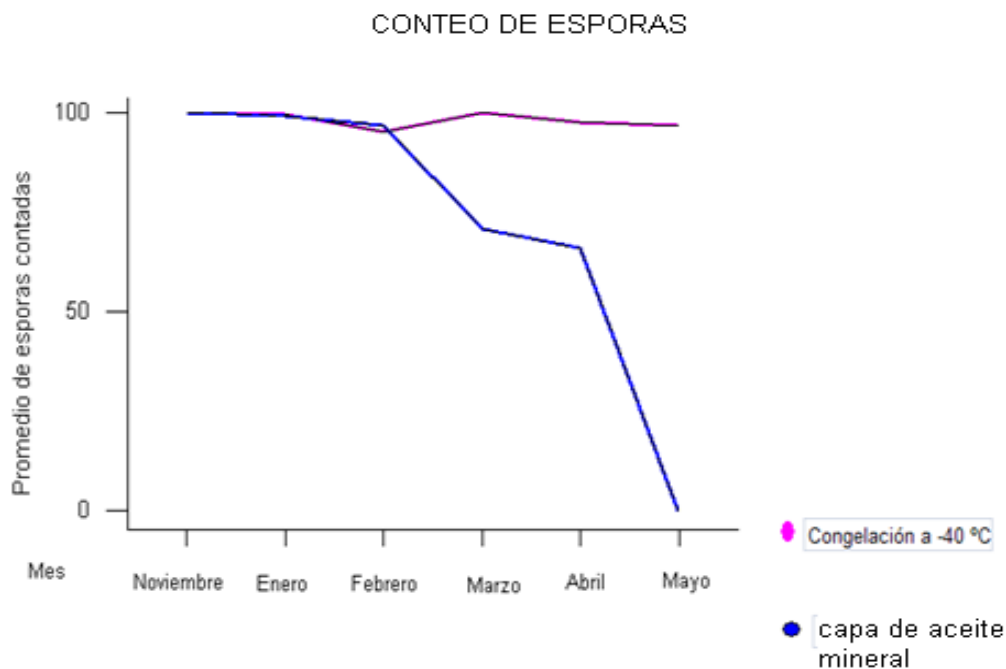


Fig. 8. Gráfica de conteo de esporas de *A.niger* en los dos métodos de conservación realizados.

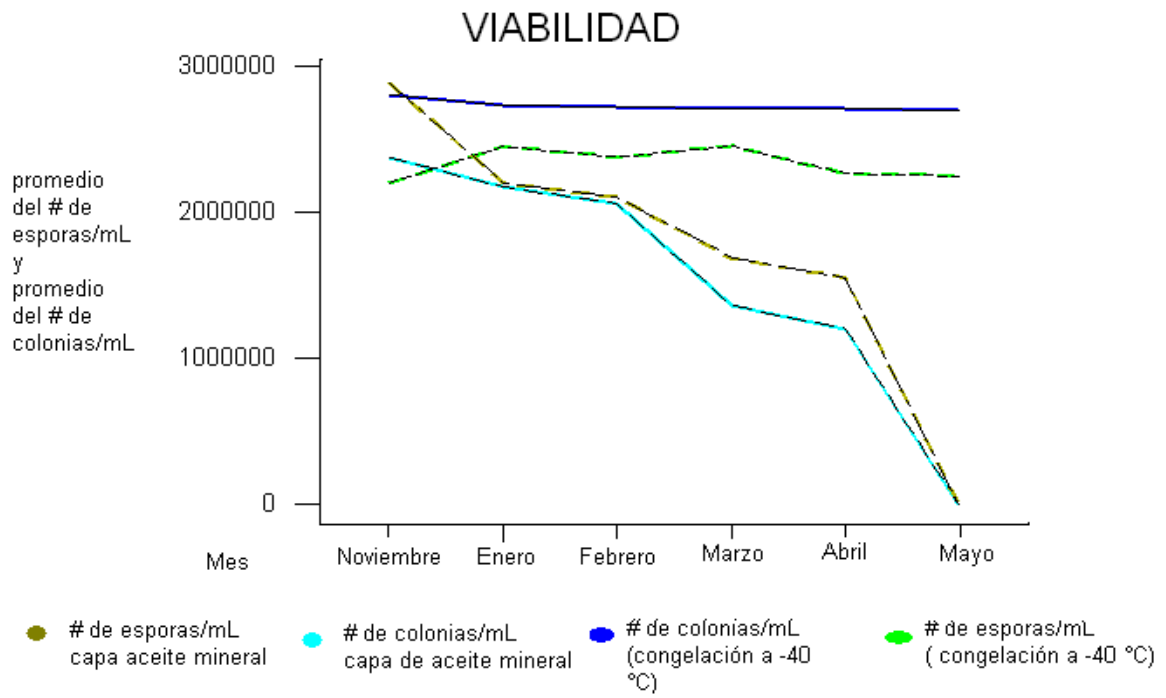


Fig. 9. Gráfica donde se observa la viabilidad evaluada en conteo de esporas y conteo de colonias para las cepas de *A.niger* en ambas técnicas de conservación.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente trabajo se logró la conformación del cepario de *A.niger* mediante la implementación de dos técnicas de conservación: bajo capa de aceite mineral cubriendo el medio sólido inclinado completamente y congelación a -40 °C, ambos fueron monitoreados durante seis meses, evaluando cada mes viabilidad celular, pureza y estabilidad morfológica de la cepas.

El uso de la técnica de conservación bajo capa de aceite mineral a temperatura ambiente cubriendo el medio sólido completamente permite detener el metabolismo y evita cambios morfológicos y fisiológicos significativos, principalmente pérdida de la capacidad esporulativa que es una característica primordial que nos permite evaluar la viabilidad.

Referente a la técnica de congelación a -40 °C empleando un agente crioprotector leche descremada al 10% evita el lisado de las células al momento de congelar y descongelar previniendo así la formación de cristales y el choque térmico, proporcionando las condiciones necesarias de estas al momento de ser requeridas para lograr un desarrollo favorable de los microorganismos.

La técnica de congelación a -40 °C (Fig. 7), arrojó resultados dentro de especificaciones establecidas, donde la viabilidad se mantuvo por arriba del 70%, lo cual coincide con los resultados reportados Rico et al.⁴ donde mencionan que todas las cepas conservadas por este método fueron reactivadas favorablemente tomando en consideración que las cepas son muy jóvenes en comparación a las que se utilizaron en el presente trabajo; sin embargo no presentaron cambios significativos, las cepas permanecieron libres de contaminación durante el periodo de estudio.

Respecto a la técnica de conservación bajo capa de aceite mineral los resultados de viabilidad celular muestran decadencia debido a que se encuentran por abajo del porcentaje mínimo especificado (Fig. 7 y 9), presenta cambios significativos en su fisiología como pérdida y/o escasa esporulación después de un periodo de seis meses de estudio. Esto coincide con los resultados reportados por Henao et al.⁴⁵ donde se observa pérdida de la viabilidad en un lapso de tiempo muy corto para este método. Sin embargo las cepas mantuvieron su pureza y morfología colonial y microscópica.

Para la determinación confiable de la viabilidad en las dos técnicas de conservación se realizó el conteo en la cámara de Neubauer y como comúnmente se realiza se complementó con las diluciones para sembrar posteriormente en placas de OGG y determinar el número de colonias/mL. En el caso de la técnica de congelación a -40 °C los resultados del conteo de viabilidad tanto de colonias/mL y esporas/mL (fig. 9) no variaron mucho esto se debe a que de igual forma en la suspensión de esporas empleadas para el conteo se encuentran otros

residuos como agar y micelio. Influyen los factores como edad de las cepas, estado fisiológico de las células, concentración inicial de las células al monitorear este parámetro.

La técnica más eficiente resultó ser la crioconservación para este estudio también debe considerarse que su agente protector leche descremada es uno de los más adecuados para los hongos filamentosos *A. niger* ya que mantuvo constante y en porcentaje elevado la viabilidad. Es necesario considerar las propiedades y formulación de estos para asegurar los microorganismos al momento de someterlos a tratamiento como en la congelación y evitamos el daño celular de esta forma, su crecimiento en las placas de OGG fue en un periodo no mayor a 7 días, conservando pigmentación y sin cambios significativos.

En general los parámetros que se evaluaron en este trabajo demuestran la factibilidad del método de crioconservación de aislados fúngicos *A. niger* por un periodo de tiempo considerable.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al evaluar la viabilidad, permiten demostrar que la técnica de congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ es la más adecuada para las cepas de *A. niger*, así mismo se mantuvo la pureza y características originales. Estos resultados demuestran que la naturaleza del agente crioprotector desempeña un papel fundamental para obtener actividad eficiente en la conservación ya que no solo actúa manteniendo la viabilidad sino además le proporciona estabilidad fisiológica.

Mientras que la técnica de conservación bajo capa de aceite mineral a temperatura ambiente no se recomienda para este hongo debido a que presenta cambios muy significativos como la pérdida de la capacidad de esporulación.

Debe tomarse en cuenta que dependiendo de las características y condiciones en las que se encuentran las cepas a trabajar debe ser la técnica a seleccionar para asegurar su manutención y evitar la pérdida, es conveniente aplicar más de dos técnicas simultáneamente siempre y cuando estén al alcance en el laboratorio.

Todo método válido no es eficiente al 100% solo refleja un equilibrio, donde las ventajas superan a las desventajas, los mismos mecanismos que producen efectos favorables no pueden evitar ocasionar daños no deseados; conjuntamente de esta forma se mantiene el material biológico de interés, reduciendo la posibilidad de pérdida total de los caracteres propios del microorganismo, ya sea por pérdida de la viabilidad, cambios en las condiciones de almacenamiento o presencia de contaminación.

REFERENCIAS

1. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2ª ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1999.
2. 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.
3. Brock TD. Microbiología de los microorganismos. 2ª ed. Barcelona:Ediciones Omega;1988.
4. 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/FABI_CIB_8_2004_pag_163_172.pdf
5. 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>
6. Feltham R K, et al. [Short communication a](#) immersing the vials in boxes containing solid CO₂. 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>
7. Jawetz ED, Meink JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 15ª. ed. México: El manual moderno; 1996.
8. Prescott CS. Industrial microbiology. Westport, Connecticut: Avi Publishing. Company Inc; 1982.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico, 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1999.
10. López MR, Méndez TLJ. Micología Médica. México: Trillas; 1995.
11. Ingraham LJ. Introducción a la microbiología. 1ª edición. Barcelona: Reverte; 1998.
12. Baker JF. Manual de Técnicas de Micología Médica. Zaragoza: Acribia; 1990.
13. Cepas de referencia [en línea]. Acceso 16 de junio de 2009. Disponible en <http://bioaplicaciones.galeon.com/ENAC/micro/pageA2.html>
14. Kumar K. Awthasti S. Madhu A, Gurudut S. Role of Cryoprotectants on the Viability. Food Biotech. 2009; 23:243-265.
15. Leveau J, Bouix M. Microbiología Industrial. Zaragoza: Acribia; 2000
16. Onions, A. Smith's Introduction to Industrial Mycology. 7ª edición. London: Halsted Press. 1981.
17. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying. J Microbiological Methods. 2006; 66 (2):183-193.
18. Soriano AR. Conservación de bacterias por congelación. [Tesis Licenciatura]. México, DF.UNAM; 2008
19. Hunter CJ, Belt A. Maintaining cultures for biotechnology and industry.
20. Thoma RW. Benchmark Paper in microbiology, industrial microbiology. Vol. 12. Inc. Pennsylvania. USA: Editorial Dowden, Hutchinson & Ross; 1977.

21. Forbes BA, Sahm DF, Weisfeld AS. Bailey & Scott, Diagnóstico microbiológico. 11^a 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. Nivel. [Organización cepario \[1\].doc](#), acceso 20 de julio de 2009. Disponible en: intranet.gobhuila.gov.co/calidad/.../organizacion%20cepario.doc
25. [Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos](#) [en línea]. **Acceso 16 de junio de 2009 .Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/colecciones-cultivos-microbianos/colecciones-cultivos-microbianos.pdf>**
26. Schlegel GH. Microbiología General. Barcelona: Omega; 1997.
27. Granados PR, Villaverde PC. Microbiología. 2^a ed. México: Paraninfo Thomson Learning; 2002.
28. Tay J. Microbiología y parasitología médicas. 3^a ed. México. Méndez editores: 2003.
29. Moore LE. Fundamentals of the Fungi. 3^a ed. USA: Prentice Hall; 1990
30. Arenas GR. Micología Médica Ilustrada. 3^a ed. México: McGraw – Hill; 2008.
31. Prats G. Microbiología Clínica. ed. Médica panamericana. México. 2006.
32. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Argentina: Salta: 2003, v.1.
33. Baker JF. Manual de técnicas de micología medica. Zaragoza: Acribia; 1990.
34. Smith JE. Biotechnology Handbooks. *Aspergillus*. USA: Plenum Press; 1994.
35. [Microbiología General I, FES Zaragoza, UNAM](#), 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
36. [Informe final del Proyecto E016 Colección de microorganismos del CINESTAV-IPN, conabio.gob.mx](#) [en línea]. acceso 20 de julio de 2009. Disponible en www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/.../InfE016.pdf
37. Arias RS. Criopreservación, bases físico-químicas, diferencias entre congelación rápida y controlada, control de calidad. [Tesis Licenciatura]. México, DF. UNAM; 2001.
38. Wiseman A. Principios de Biotecnología. España: Acribia; 1986.
39. Carlile MJ, Watkinson SC. The Fungi. USA: Academic Press Limited; 1994.
40. Ayala A, Philippe B, Hummelt G, Piñera G, Rosenstein Y, Negrete MG. Catálogo de Microorganismos. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Biotecnología. UNAM, 1988.
41. Peter, G., Reichart, O. The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected microorganisms during freezing and thawing. *Acta alimentaria*. 2001; 30:89-97.
42. Kearney L, Upton Mary, Mc A. Incorporating cryoprotectans. *Appl and Environm Microbiol*. 1990; 56 (10):3112-3116.
43. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2^a ed. México. Méndez editores: 2000.
44. Bennett JW, Klich MA. *Aspergillus*. Biology and Industrial Applications. USA: Butterworth-Heinemann; 1996.

45. Henao I, Correa MF, Marin G. Evaluación de métodos de conservación con actividad enzimática amilolítica [en línea] acceso septiembre 2009. Disponible en [http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/evaluación métodos/ pdf](http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/evaluación%20métodos/pdf)
46. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Micología*. 1998; 15: 166-168.