



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera Química Farmacéutico Biológica

Implementación de un método de crioconservación en capilar para hongos miceliales no patógenos

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BÍOLOGO

P R E S E N T A :

ROMERO MARTÍNEZ MARCO ANTONIO

DIRECTOR: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

ASESORA: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Lugar de desarrollo:

LABORATORIO 1 PLANTA ALTA DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA



Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIIME PE202716

MÉXICO, D.F. 2016



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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Antecedente	3
Clasificación del reino Fungi	5
Generalidades	8
¿Qué son los hongos?.....	8
Características de los hongos.....	8
Taxonomía.....	9
Hongos filamentosos.....	10
Características de las divisiones	11
Chytridiomycota	11
Zygomycota	12
Ascomycota	12
Basidiomycota	13
Características de las cepas micóticas miceliales	13
<i>Aspergillus niger</i>	13
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13
<i>Aspergillus flavus</i>	14
<i>Penicillium chrisogenum</i>	14
Conservación de cepas microbianas	15
Conservación a corto plazo	16
Conservación a mediano plazo	18
Conservación a largo plazo	20
Otras técnicas	24
Cultivo en agua destilada.....	24
Crioprotectores.....	25

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO	27
MATERIAL	27
MÉTODO	29
RESULTADOS	35
ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47
ANEXO	50

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la mejor universidad de Latinoamérica, por acobijarme durante mi estancia y por todo el apoyo que recibí por parte de la misma.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser mi segunda casa, por todos los conocimientos que me brindaron para terminar esta etapa. A todos aquellos profesores que me impartieron clase y me fueron formando y cimentando mis conocimientos.

A mi director de tesis:

El Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por ser una persona humilde y sencilla, por estar ahí conmigo apoyándome en todo el momento durante mi tesis, por compartirme sus conocimientos conmigo.

A mi asesora de tesis:

A la Mtra. Yolanda Flores Cabrera por brindarme esa confianza y apoyarme en cada momento con mi tesis. Por impulsarme a seguir adelante y darme buenos consejos.

A mis profesores:

Al Dr Rubén Marroquín Segura, por la oportunidad de darme y trabajar en su laboratorio, por ser un muy buena persona y de buen corazón.

A mi revisora de tesis la Mtra. Patricia Vidal Millán, por sus conocimientos y su compromiso y al motivarme a seguir adelante, por ser una muy buena persona y maestra.

A mi sinodal de tesis el Mtro. Manuel Orduña Sánchez por su amabilidad y su tiempo que me brindó.

Al Sistema de Becas para Estudiantes Indígenas por apoyarme en estos años de mi carrera y de titulación, por estar ahí presente en cada momento. Por otórgame ese apoyo y valorar a los estudiantes indígenas y motivarlos a seguir adelante.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a Dios, por darme la vida, el conocimiento y la sabiduría. De iluminarme y guiar mi camino, por ser mi fortaleza en los momentos débiles, por esta conmigo presente en cada momento.

Le doy gracias a mis padres, Baldomero Romero y Julia Martínez, por estar conmigo en todo momento, es los días más difíciles nunca me abanderaron, en darme buenos consejos de la vida, a ayudarme a levantar cuando me daba por vencido, por todo ello, gracias.

A mis hermanos, Jorge, Carlos, Oliva, Felicitas y Adalberto, por ser ejemplos a seguir y a darme ánimos para seguir adelante y nunca rendirme, por su gran apoyo.

A mis amigos de la Estudiantina, por todos los momentos que viví con ellos y los tengo muy presente, por los ánimos de cada uno de ellos a seguir adelante y luchar por lo que uno ama en la vida.

A mis profesores de la facultad, por ser los mejores maestros y darme las enseñanzas y conocimientos en cada clase impartida, por su tiempo y dedicación.

1. RESUMEN

La importancia de conservar cepas puras e identificadas como cepas ATCC para la investigación en ciencias biológicas, la autenticación de microorganismos, en procesos biotecnológicos o en la calibración de equipos de identificación microbiológica ha originado una necesidad en la implementación de métodos de conservación a largo plazo de los microorganismos que asegure su viabilidad y conserve sus características bioquímicas. El uso de compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores: glicerol, dimetilsulfóxido (DSMO), leche descremada e hidratos de carbono (glucosa, lactosa, etc.) en los métodos de conservación ha sido de gran ayuda para el área clínica así como para el sector industrial, puesto que estos agentes protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas como la deshidratación y los daños que se pueda producir en el proceso de la congelación, la elección del mismo va a depender del tipo de microorganismo a conservar. En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z) de la FES Zaragoza se utilizan cepas fúngicas para el desarrollo de microtécnicas, actualmente en el laboratorio no se cuenta con algún método de conservación para hongos miceliales, por lo cual el propósito de este proyecto fue implementar un método de conservación acordes a las necesidades del laboratorio, como resultado se logró la implementación de un método de conservación en capilar de hongos miceliales utilizando como agente crioprotector leche descremada capaz de mantener la viabilidad, las características bioquímicas y morfología de las cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium chrisogenum* durante 180 días a una temperatura de conservación de -20° C, implementado este método a distintas cepas podríamos reducir costo y espacio del almacenamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos de interés farmacéutico (antibióticos, vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas), en la elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores), fabricación de disolventes y reactivos, su capacidad de disolver y transformar en sales los minerales de hierro o de níquel, la producción de ácido acrílico para conseguir plásticos sin necesidad de recurrir al petróleo entre otras aplicaciones.

El objetivo de una colección de cultivos es el de mantener y preservar en un estado viable y sin cambios en cualquiera de sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas, conservando la cepa para la investigación, la enseñanza y los procesos biotecnológicos; en la actualidad hay una tendencia a concentrar los recursos biológicos importantes de microorganismo conservados para la industria, la agricultura y la investigación.

La creciente conciencia del papel de los hongos en humanos y fitopatología, el reconocimiento generalizado de la función de estos organismos en descomposición y el deterioro, la utilización de mutantes fisiológicos exigentes a largo plazo y el aislamiento continuo de nuevas formas, han dado lugar a la acumulación de vastas colecciones de cultivos fúngicos. En caso particular de los hongos filamentosos son frecuentemente mantenidas con subcultivo de rutina a medios frescos; este es un método laborioso, propenso a la contaminación y a las variaciones genéticas y fisiológicas durante el mantenimiento a largo plazo por lo tanto para superar estas limitaciones se han desarrollado técnicas para preservar cepas de hongos.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la UMIEZ F.E.S. Zaragoza actualmente no se cuenta con un método de conservación de cepas micóticas que garantice la viabilidad y estabilidad bioquímica de sus cepas sin que tengan pérdidas mayores a un 30%, por lo que el propósito de este proyecto es desarrollar un método de conservación acorde a las necesidades del laboratorio

3. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedente

Conforme aumenta el descubrimiento de nuevas especies de organismos es necesario ordenar con base en sus características y propiedades, así surge la taxonomía. Uno de los grupos de mayor controversia en su clasificación ha sido el de los hongos; en un inicio fueron incluidos en el reino *Plantae*, división *Mycotica* y subdivisión *Tallophyta*, lo cual se originó por la similitud de las setas (hongos macroscópicos) con las plantas; sin embargo ahora se sabe que una de las diferencias básicas entre ambos radica en que los hongos no llevan a cabo el proceso de la fotosíntesis.

La segunda clasificación los colocó dentro del reino protista, creado por Haeckel (1866), quien a su vez lo dividió en dos grupos: protista inferior, donde se incluía a las bacterias y protista superior (eucariontes) para protozoarios, algas y hongos. En 1956 Copeland y Martin crearon dos nuevo reinos, que más tarde Whittaker (1969) modificó en: *Monera*, para las bacterias y otros microorganismos y *Fungae* para los hongos y líquenes.¹

En 2002 Bryce Kendrick fundamentado en otras técnicas como la inmunología y la biología molecular, clasifica a los organismos vivos en siete reinos: Archaeobacteria, Eubacterias, Chromista, Protozoa, Fungi, Plantae y Animalia. Los dos primeros tienen células procariontes y se llaman también dominios; los demás son eucariontes.²

Cuadro 1.1 clasificación de los reinos y divisiones (phyla) de los hongos (Kendrick, 2002) ¹

Tipo de célula	Reino/phyla (división)
Procarionte	<ul style="list-style-type: none"> • Archeabacteria • Eubacteria
Eucarionte	<ul style="list-style-type: none"> • Protozoa Plasmodiophoromycota Acrosiomyota Myxomycota Dictyosteliomycota <ul style="list-style-type: none"> • Chromista Hyphochytriomycota Oomycota Labyrinthulomycota <ul style="list-style-type: none"> • Fungi Chytridiomycota Zygomycota Basidiomycota Ascomycota <ul style="list-style-type: none"> • Plantae • Animalia

2.2 Clasificación del reino Fungi

La primera clasificación que surgió fue la empírica que, de acuerdo con el aspecto macroscópico que presentan divide a los hongos en cuatro grupos.

- a) Hongos macroscópicos o setas
- b) Mohos u hongos filamentosos
- c) Levaduras u hongos de crecimiento limitado cremoso
- d) Actinomicetos o bacterias filamentosas de crecimiento limitado y rocoso

Tal clasificación aún conserva validez para reconocer a los hongos trivialmente, su taxonomía ha sufrido modificaciones de acuerdo con las nuevas propiedades y características que se van descubriendo. Bajo el punto de vista macroscópico y microscópico solo hay dos tipos: mohos denominados también hifomicetos, que dan colonias filamentosas y circulares en medio con agar, y globosas en caldo; y las levaduras o blastomicetos, los cuales forman colonias cremosas similares a las bacterianas. De aquí surge una división sencilla de los hongos con base en sus características de crecimiento. ¹

2.2.1 Clasificación de los hongos con base en su morfología colonial y reproductiva.¹

Tipos de hongos*	Descripción
Hyphomycetes (hifomicetos)	Hongos filamentosos o mohos: <ul style="list-style-type: none">a) Hialohifomicetos, sin pigmentos melánicosb) Feohifomicetos, con pigmentos melánicos
Blastomycetes (Blastomicetos)	Hongos levaduriformes o levaduras
Coelomycetes	Hongos que nacen de cuerpos fructíferos asexuales cerrados (picnidios y acérvulo)

Anteriormente subclases de Deuteromycetes

La clasificación de los hongos (phylum o división), clases, familias, géneros y especies ha presentado diversos cambios taxonómicos; actualmente se han ordenado y existen varias clasificaciones, la mayoría de ellas basadas en las propiedades morfológicas, reproductivas, fisiológicas y sobre todo de biología molecular. Las dos más representativas se muestran en el cuadro.¹

2.2.2 Dos tipos de taxonomía de los reinos y divisiones (phyla) de los hongos ¹

Reinos/phyla McLaughlin (2001)	Reinos/phyla Guarro J. (1999)
Fungi <ul style="list-style-type: none"> • Chytridiomycota • Zygomycota • Basidiomycota • Ascomycota • Pseudomycota • Oomycota • Hypochytriomycota • Plasmodiophoromycota 	Protozoa Chromista Fungi <ul style="list-style-type: none"> • Chytridiomycota • Zygomycota • Basidiomycota • Ascomycota

El reino Fungi, que algunos autores denominan también Eumycota debido a que ahí se incluye los grupos de hongos de interés medico: incluso de esta división pocas son las clases y subclase de interés, los más importantes son los Ascomycetes y Zigomycetes, donde se incluyen sólo algunos hongos patógenos oportunistas. Los Basidiomycetes cada vez tienen más importancia médica, la mayoría son hongos macroscópicos o setas y son estudiados por las intoxicaciones que producen (micetismo), pero actualmente muchos grupos de patógenos microscópicos han sido reclasificados en diferente familias, pertenecientes a esta división.

En el pasado se tenía una división o phylum denominada Deuteromycetes o Fungi imperfecto, donde se consideraba a la mayoría de los hongos de interés patógeno. Esta división ya no existe y los hongos que la integraban prácticamente quedan incluidos dentro de las divisiones y clases citadas; este cambio ocurre porque antes, al clasificar un hongo, solo se tomaba en cuenta la morfología y forma de reproducción, mientras que ahora es de suma importancia su posición filogenética determinada por biología molecular de acuerdo con la secuencia de los ácidos nucleicos (mitocondriales y ribosómicos). Así en la actualidad al grupo de Deuteromycetes se les considera como hongos mitosporicos, es decir, que llevan a cabo solo mitosis, llamados por algunos autores anamórficos, lo que significa que sólo se reproducen de forma asexual o por mitosis, términos que se siguen usando como sinónimos. ¹

2.2.3 Clasificación de las phyla (divisiones) y clase de los hongos (Guarro et al., 1999. Aceptada por el Diccionario Internacional de Hongos).¹

Reino	Phyla (divisiones)	Clase
Fungi (llamado también Eumycota)	<ul style="list-style-type: none"> • Chytridiomycota • Zygomycota • Basidiomycota • Ascomycota 	Zygomycetes Trichomycetes Basidiomycetes Teliomycetes Ustomycetes Loculoascomycetes Plectomycetes Pyrenomycetes Ascomycetes basales

2.3 Generalidades

2.3.1 ¿Qué son los hongos?

Los microbiólogos emplean el término hongo (del latín *fungus*, seta) para describir organismos eucariotas, portadores de esporas, con nutrición por absorción, carentes de clorofila, que se reproducen de forma asexual y sexual. Los científicos que estudian los hongos son micólogos (del griego, *mykes*, seta, y *logos*, ciencia), y la disciplina científica que estudia los hongos es micología así como el estudio de las toxinas de los hongos y de sus efectos recibe el nombre de micotoxicología y las enfermedades producidas por los hongos se conocen como micosis. De acuerdo con el árbol filogenético universal, los hongos son miembros del dominio *Eucaria*, los análisis filogenéticos moleculares, morfológicos y bioquímicos demuestran que *Fungi* constituye un grupo monofilético, a menudo se le denomina hongos verdaderos o *Eumycota* (del griego, *eu*, verdadero, *mykes*, hongo).³

2.3.2 Características de los hongos

La micología es el estudio de hongos.²

Los hongos son heterótrofos, se alimentan por absorción, están formados por células eucariotas y pueden ser uninucleados o multinucleados; el conjunto de las hifas, el cual forma el micelio puede ser homotálico o heterotálico, dicariótico y rara vez diploide. La pared celular está constituida por polisacárido del tipo de la quitina (N-acetilglucosamina) y también se encuentran mananas, glucanas y celulosa. El principal componente lipídico de la membrana celular es el ergosterol, compuesto cuya síntesis se ve afectada por los antimicóticos azólicos. Son aerobios, los hongos unicelulares están representados por las levaduras y los multicelulares por los hongos filamentosos.⁴

2.3.3 Taxonomía

El reino de los hongos (Fungae) se compone de una escalera taxonómica; la familia está compuesta por géneros y estos contienen las especies. Los hongos reciben el nombre de teleomorfos si tienen reproducción sexual (meiosis) y anamorfos si ésta es asexuada (mitótica), cuando presentan ambas modalidades de reproducción se denominan holomorfos (*Trichophyton ajelloi*, anamorfo. *Arthroderma uncinatum*, teleomorfos)

2.3.3 Taxonomía de los hongos ²

Filo (phylum)	-cota	Eumycota
Subfilo	-cotina	Ascomycotina
Clase	-mycetes	Plectomycetes
Orden	-ales	Eurotiales
Familia	-aceae	Gymnoascaceae
Género		Nannizzia
Especie		Nannizzia incurvata

Dentro del superreino Eucarionte, se estudian los hongos en el reino Fungae, separados de las plantas y los animales. Éste comprende varios filos: Myxomycota y Oomycota, que ahora se consideran pseudohongos; Chytridiomycota y Zygomycota, que son hongos inferiores, y Ascomycota y Basidiomycota que corresponden a hongos superiores o meiospóricos, que tienen una reproducción sexual conocida. ²

En las clasificaciones antiguas se mencionaba un phylum, donde se colocaba a los hongos a los que no se les había descubierto su forma de reproducción sexual; esta categoría taxonómica, llamada Deuteromycota, no se emplea actualmente, pues se considera que con los estudios disponibles hoy en día es posible agrupar a todos los hongos en alguna phyla. En todo caso, es mejor llamar mitospóricos a

los hongos sin reproducción sexual conocida y meiospórico a los hongos con reproducción sexual conocida.³

Los hongos inferiores se caracterizan por presentar filamentos gruesos cenocíticos o no tabicados, multiplicación asexual por esporas endógenas y reproducción sexual por oosporas o zigosporas.

Los hongos superiores presentan filamentos tabicados y multiplicación asexual por esporas externas (conidios) aisladas o en cadenas o dispuestas.²

2.4 Hongos filamentosos

El tallo (cuerpo) de los hongos filamentosos o carnosos está formado por filamentos largos de células unidas, estos filamentos, que se denominan hifas, pueden crecer hasta proporciones inmensas. Las hifas de casi todos los hongos filamentosos contienen tabiques que las dividen en unidades separadas similares a una célula mononucleada, estas hifas se denominan tabicadas. En algunas clases de hongos las hifas no contienen tabiques y aparecen como células continuas y largas con muchos núcleos, estas hifas se denominan cenocíticas. Incluso en los hongos con hifas tabicadas hay aberturas en los tabiques que forman un continuo citoplasma de “células” adyacentes; estos hongos en realidad también son organismos cenocíticos.

Las hifas crecen alargándose de sus extremos, cada parte de una hifa puede crecer y cuando se desprende un fragmento puede alargarse para formar una hifa nueva. En el laboratorio los hongos suelen cultivarse a partir de fragmentos obtenidos del tallo.

La porción de una hifa que tiene nutrientes se denomina hifa vegetativa; la porción que participa en la reproducción es la hifa reproductiva o aérea, llamada así porque se proyecta sobre la superficie del medio en el que está creciendo el hongo. A menudo las hifas aéreas poseen esporas reproductivas. Cuando las condiciones ambientales son convenientes las hifas crecen hasta formar una masa filamentosa denominada micelio que es visible a simple vista.³

2.5 Características de las divisiones

La larga historia evolutiva de los hongos es rica en ejemplos de evolución convergente y divergente; es decir, muchas estructuras funcional y estructuralmente similares evolucionaron de forma independiente (convergente), mientras otras estructuras se han vuelto diferente (divergente) con el tiempo. Al carecer de registro fósil extenso, el uso de la morfología en el análisis filogenético es limitado, sin embargo, el análisis de las secuencia del rRNA 18S y de ciertos genes que codifican proteínas, han demostrado que Fungi consiste en un grupo monofilético con ocho subdivisiones. Cuatro de ellas se han considerado como grupo separados durante algún tiempo –Chytridiomycetes, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota, las otras cuatro –Urediniomycetes, Ustilaginomycetes, Glomeromycota y Microsporidia- han sido propuestas recientemente como grupos separados.

2.5.1 Chytridiomycota

Los hongos más sencillos pertenecen a Chytridiomycota o quitridios. Son únicos entre los hongos por la información de una zoospora con un único flagelo posterior que presenta movimiento en latigazo, esto se considera un rasgo primitivo, que se ha perdido en los hongos más evolucionado. Los miembros de vida libre de este taxón son saprofitos, las formas parasitas infectan a plantas acuáticas y animales, incluyendo insectos.

Chytridiomycota muestra diversos ciclos vitales, que implican tanto reproducción asexual como sexual. Los miembros de este grupo son de tamaño microscópico y puede consistir en una única célula, una pequeña masa multinucleadas o un verdadero micelio con hifas capaces de penetrar en sustratos porosos. La reproducción sexual da como resultado la liberación de esporangiosporas a partir de esporangios en la superficie. El género *Allomyces* se utiliza en el estudio de la morfogénesis.

2.5.2 Zygomycota

La subdivisión Zygomycota contiene los hongos denominados zigomicetos. La mayoría viven sobre material vegetal y animal en descomposición en el suelo; algunos son parásitos de plantas, insectos, otros animales y seres humanos. Las hifas de los zigomicetos son cenocíticas, con muchos núcleos haploides, las esporas asexuales, habitualmente dispersadas por el viento, se desarrollan en esporangios situados en la punta de las hifas aéreas, la reproducción sexual produce cigotos duros, de pared gruesa llamados zigosporas, que pueden permanecer en estado latente si el ambiente resulta excesivamente hostil para el desarrollo del hongo.

2.5.3 Ascomycota

La subdivisión Ascomycota contiene los hongos denominados ascomicetos, comúnmente conocidos como hongos con asca. Los ascomicetos tienen importancia ecológica en hábitat de agua dulce, marina y terrestre, ya que degradan muchos compuestos orgánicos químicamente estables, incluyendo la lignina, la celulosa y el colágeno.

Los ascomicetos reciben este nombre por su estructura reproductora característica, el asca (del griego, asko, saco) en forma de saco, muchos ascomicetos son levaduras y el término levadura se emplea para designar a todos los hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación o fisión binaria.

Los ascomicetos filamentosos forman hifas tabicadas, en estos hongos es habitual la reproducción asexual, que tiene lugar mediante conidiosporas. La reproducción sexual conlleva así mismo la formación de ascas, donde cada una porta por lo general ocho ascosporas haploides, aunque algunas especies pueden producir más de 1000.

2.5.4 Basidiomycota

Basidiomycota incluye a los basidiomicetos, conocidos comúnmente como hongos en forma de maza. Son ejemplos los hongos gelatinosos, las royas, hongos en repisa, falos (falo hediondo), cuescos de lobo, matamoscas, champiñones y hongos nido de pájaro. Los basidiomicetos reciben este nombre por su estructura o células características, el basidio, implica en la reproducción sexual. En la punta de las hifas se producen un basidio (del griego, basidion, base pequeña) y normalmente tienen forma de maza. El basidio produce dos o más basidiosporas y los basidios pueden estar contenidos en el interior de cuerpo fructíferos llamados basidiocarpos.⁵

2.6 Características de las cepas micóticas miceliales

2.6.1 *Aspergillus niger*

Las colonias de *A. niger* se reconocen instantáneamente por su superficie cubierta de densos acúmulos de conidias negro-azabache, lo que les confiere un típico aspecto de colonias espolvoreadas con pimienta. El reverso de la colonia es gamuzado gris-amarillento, lo que distingue a *A. niger* de los hongos dematiáceos; vista al microscopio, la formación de conidias es en extremo abundante, al punto que las vesículas se encuentran ocultas por densos agregados de conidias negras, esféricas, de 3 a 5 μm de diámetro, que se hacen rugosas cuando maduran. Las vesículas cuando se ven son globosas y miden hasta 75 μm de diámetro.

2.6.2 *Aspergillus fumigatus*

Las colonias de *A. fumigatus* son desde granuladas a algodonosas y habitualmente tiene un cierto tono verdoso, gris-verdoso marrón-verdoso. En la

periferia en el borde de crecimiento, se observa una cubierta blanca. Visto con el microscopio, los conidióforos son relativamente largos (300 a 500 μm), las vesículas tienen un diámetro de 30 a 50 μm , en forma de clava, y están cubiertas en su mitad superior por una hilera única de fiálides, que dan origen a largas cadenas de conidias esféricas o ligeramente ovoides que tienden a curvarse dirección del eje central. ⁶

2.6.3 *Aspergillus flavus*

Crece en los medios de cultivo ordinarios como Sabouraud y PDA a 28° C. presentan colonias de crecimiento rápido. ⁷

Las colonias de *A. flavus* desde granulares a vellosas y poseen cierto tono amarillo o marrón amarillento. Microscópicamente los conidióforos son largos (400-800 μm), y tienden a ser rugosos en la zona inmediatamente inferior a una vesícula globosa que mide entre 25 y 45 μm de diámetro. Las fiálides se originan de todo el perímetro de la superficie de la vesícula y pueden tener una hilera de fiálides (monoseriados) o, lo que es más característico o ligeramente, dos (biseriados). Las conidias son esféricas, lisas o ligeramente rugosas cuando maduran y forman cadenas relativamente largas. ⁶

2.6.4 *Penicillium chrysogenum*

Este hongo es el mejor para la producción de penicilina. Esta especie se ha aislado de diferentes sustratos y hábitats, tales como: goma, aire acondicionado, cuero, el agua, los bosques, cuevas, las minas de uranio, papel, pergamino, plantas, polvo atmosférico (dentro de los edificios), productos alimenticios (cereales), suelo. El micelio de *P. chrysogenum* puede alimentar a ácaros, tales como: *Acaro siro*, *putrescentiae Tyrophagus*, *mesembrinae Pygmephorus*.

Colonias de crecimiento rápido, alcanzando un diámetro de 4 cm en 7 días con superficie de la colonia vellosa, aterciopelada, de color verde claro a verde-azul con una corona radial ancha y blanca.

Presenta conidióforos tabicados de paredes lisas, hialinos, usualmente triverticilados (fiálides que nacen desde métulas o desde métulas sustentadas por ramas respectivamente), ramificado al final; con métulas y fiálides en forma cilíndrica, donde nacen conidios lisos, subglobosos a elipsoidales, hialinos o verde azules.⁷

2.7 Conservación de cepas microbianas

Cuando se seleccione el método de conservación es preciso tener en consideración el tiempo que se desea mantener conservados los cultivos, las características de los microorganismos a conservar y los recursos con los que se cuenta en el laboratorio.

Los procedimientos de conservación son muy numerosos y variables, su utilidad dependerá de que permitan la supervivencia de al menos el 70-80% de las células y que estas a su vez, permanezcan sin sufrir mutaciones o algún tipo de proceso de recombinación genética.⁸

Para la conservación de microorganismos a largo plazo ha llegado a ser necesario desarrollar métodos fiables que produzcan organismos viables sin cambios en su morfología y fisiología después de ciertos periodos prolongados de almacenamiento.^{9,10}

Métodos de resiembra continua para mantener aislado sólo se puede utilizar para el corto plazo. Los métodos que reducen las tasas de metabolismo de microorganismo son para almacenamiento a largo plazo, pero no todos los almacenados de esta manera sobreviven.¹¹

Muchas de estas técnicas no son compatibles con todos los hongos por las características particulares de cada especie.¹²

Existen métodos alternativos, se recurren a ellos cuando no se puede utilizar alguno de la elección, los cuales integran la supresión de la evaporación, la

transferencia periódica, la suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril, etc. Debido a que no aseguran la conservación del genotipo, nunca se debe usar un único método alternativo, si no que se recomienda conservar utilizando, simultáneamente al menos dos técnicas.

También existen métodos restringidos, estos no se usan habitualmente. Los más comunes son: desecación en papel filtro y desecación en tierra, arena o sílica gel o algún otro soporte apropiado, estos métodos detiene el crecimiento de las células por eliminación del agua disponible. ⁸

2.7.1 CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO

2.7.1.1 Transferencia periódica

Aunque el método clásico de mantenimiento de los cultivos fúngicos por transferencia a intervalos frecuentes en sustrato sólidos o líquidos adecuados es una operación laboriosa, monótona y consume mucho tiempo, no puede tenerse en cuenta como un método de conservación a largo plazo. Mediante esta técnica miles de microorganismo se han mantenido sin cambios durante décadas en colecciones de cultivos en todo el mundo y sigue siendo el único método recomendado para ciertos grupos de hongos.

El peligro presente siempre son las variaciones de pérdidas de caracteres morfológicos y las respuestas fisiológicas. La transferencia de grandes trozos de micelios se recomienda sólo para aquellos microorganismos que no producen células propagativas especializadas, cuando las transferencia de micelios son necesarias, se debe tener cuidado para transferir a intervalos frecuentes cultivo joven con crecimiento activo. El peligro de variación aumenta cuando el inóculo se toma de la zona más vieja donde los productos acumulados del metabolismo puede haber ejercido una influencia mutagénica.

Los cultivos sellados herméticamente, que todavía están metabolizando activamente se deben evitar, ya que la acumulación de gases metabólicos puede causar efectos perjudiciales. Cultivos sellados por periodos cortos, incluso por medio de tapones de rosca o tapones parafinados son menos confiables que los de algodón. Los almacenamientos de las cultivos de hongos en tubo inclinado con agar debe de estar a una temperatura baja para evitar el secado rápido del sustrato y para prevenir el crecimiento continuo de los cultivos. Almacenamientos frigoríficos a 5 °C se ha encontrado satisfactorio para la mayoría de los hongos. Conservar a temperatura ambiente requeriría demasiada frecuencia en la transferencia en la mayoría de los laboratorios.

La técnica de transferencia periódica tiene la ventaja de hacer cultivos inmediatamente disponibles para la comparación, pero sigue siendo el más laboriosa de todos los métodos. Otras objeciones a esta técnica se puede vencer en gran medida a través de una cuidadosa selección de un adecuado sustrato, el uso de la técnica de transferencia de masa de esporas, vigilancia continua para evitar el remplazo o la contaminación, y la protección adecuada contra la infestación por ácaros.⁹

2.7.1.2 Tubos inclinados cubiertos de aceite

La conservación bajo aceite mineral estéril es un método de supresión de la evaporación, consiste en cubrir con aceite mineral estéril o vaselina estéril una estría del hongo a conservar, impidiendo la evaporación del agua contenida en el medio de cultivo y evitando el incremento de presión osmótica, por concentración de los solutos, que producirían alteraciones importantes en el cultivo.⁸

Este método, que actúa mediante la prevención de la deshidratación y la disminución de la actividad metabólica y el crecimiento a través del consumo reducido de oxígeno, consiste en cubrir un cultivo de colonia joven que metabolizan activamente en un medio de agar en tubo inclinado con aceite mineral estéril (aceite de parafina); entre los hongos, este método se ha encontrado a una

amplia aplicación en la preservación de las formas micelial estrictamente o no esporulación a los que no se les puede aplicar la técnica de liofilizado.

El consumo de oxígeno de un cultivo de hongos sumergida bajo un centímetro de aceite mineral se reduce a aproximadamente el diez por ciento de lo normal dentro de unas pocas horas, la disminución de la actividad metabólica de los hongos se evidencia por el retraso del crecimiento y esporulación. Una mayor reducción de la transmisión de oxígeno por capas de aceites en exceso de un centímetro se ha encontrado menos favorables para la conservación de los hongos, aunque este efecto puede ser debido únicamente a la reducción adicional de la respiración; hay algunas evidencias de que el aceite mineral es en sí tóxicos para los microorganismos en condiciones de agotamiento completo de oxígeno.

La técnica reduce la frecuencia de la transferencia y controla eficazmente los ácaros, es un método relativamente simple, ya que no es necesario un tratamiento preliminar de los cultivos y no se requiere un aparato especial; los cultivos están siempre disponibles para la comparación y se puede utilizar en repetidas ocasiones para el trasplante, el método tiene la desventaja de que los tubos deben ser almacenados en posición vertical en todo momento, y los cultivos conservados por este método para ser susceptibles a la contaminación durante la preparación y el almacenamiento.⁹

2.7.2 CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO

2.7.2.1 Cultivos en arena o tierra

La técnica de preparación de los cultivos del suelo se clasifican en dos básicamente: a) la inoculación con un pequeño volumen de suspensión en suelo seco, seguido de secado inmediato; b) el uso de grandes volúmenes de inóculos o suelo humedecido seguido de incubación.

La primera de ellas, obviamente, no permite crecimiento y preservaría sólo los conidios introducidos en el suelo y el segundo, al permitir el crecimiento, preserva

las células de propagación y el micelio al menos una generación eliminando el inóculo original.

Los medios de transporte, como el suelo de turba, CaCO_3 , CaHPO_4 , arena de mar, arcilla y aserrín, se han sugerido para remplazar la tierra del jardín. La comparación de estos materiales como medios de almacenamiento generalmente ha demostrado ya sea arcilla o arena para ser el más satisfactorio.

Las ventajas del método de cultivo del suelo de conservación se pueden resumir de la siguiente manera: por lo general se incrementa a) la longevidad de los cultivos sustancialmente, b) cambios morfológicos se reducen o se eliminan e c) inóculo uniforme está disponible durante largos periodos si se cuida bien en el manejo de los cultivos. Sin embargo, es imposible para observar las características de crecimiento de los organismos o para detectar la contaminación sin recultivación.⁹

2.7.2.2 Secado

Los métodos de secado se basan en la eliminación de la mayor cantidad presente en el medio en el que se colocan los microorganismos, las células que sobreviven al proceso detienen su metabolismo, quedando en estado de latencia.⁸

Los cultivos para secado se cultivan en medio sólidos, los organismos no productores de esporas se secan tan pronto al obtener un buen crecimiento y los organismos con producción de esporas se continúan incubando hasta producir abundantes esporas.¹³

Desde los primeros trabajos se han realizado las siguientes generalizaciones:

- a) La desecación lenta en el aire por lo general es menos deseable que la desecación rápida en el vacío o en un desecador sobre un agente químico absorbente de agua.
- b) La presencia de materiales de protección y de diversas sustancias nutritivas mejora el periodo de supervivencia.

- c) La leche y el suero son quizás los mejores
- d) El tamaño de la muestra afecta la viabilidad
- e) El secado de cultivos sobreviven por más tiempo en refrigeración que a temperatura ambiente.

2.7.2.3 Secado de suspensiones o medios líquidos

Secado al aire simple de suspensiones de organismos en papel filtro, cuenta de vidrio, hilo, cubres o cuadros de celofán y secado por medio de desecante químicos (P_2O_5 , H_2SO_4 y $CaCl_2$), se han investigado como métodos para extender la longevidad de cultivos bacterianos.

Se ha utilizado el secado rápido por combinaciones de vacío y la desecación química sin una congelación preliminar.

El método más simple descrito se atribuye, sin referencia a Sordelli por San Juan-Brookes y por Rodas. Un asa de siembra de células se emulsiona en suero en el interior de un tubo estéril pequeño, este tubo es colocado dentro de un tubo más grande con un poco de P_2O_5 conectado a una bomba, sellado al vacío y almacenada en la oscuridad a temperatura ambiente.⁹

Secado en papel filtro, en este método se emplea papel filtro altamente absorbente (Whatman No. 3) la cual es impregnada con una solución concentrada de las células y se deja secar en condiciones estéril.

Secado con tierra, arena, sílica gel. Las células pueden ser añadidas a sustancias tales como tierra, arena o gel de sílice para protegerlos durante el secado. Microorganismos productores de esporas pueden conservarse durante largos períodos utilizando este método¹⁴

2.7.3 CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

Existen varios métodos, el de conservación a largo plazo o de elección entre las cuales están los métodos de secado y la congelación. Estos permiten detener el

crecimiento de las células, y de esta manera retardar la aparición de nuevas generaciones con lo cual se garantiza la estabilidad genética, lo que los hace los métodos más recomendados. Se emplea fundamentalmente cuando se desea mantener las cepas por periodos de tiempo prolongados.⁸

Los principales métodos de almacenamiento de los cultivos de los hongos son ahora la liofilización y el almacenamiento a ultra baja temperaturas de nitrógeno líquido, miles de aislamientos se conservan por estos métodos.¹⁵

En la actualidad, además de la liofilización, la criopreservación parece ser la mejor técnica de conservación disponible para hongos filamentosos.¹⁶

2.7.3.1 Congelación

Es un método seguro y fiable para un mantenimiento a largo plazo de la mayoría de especies de hongos, especialmente los que no se prestan a la liofilización¹⁷

La congelación consiste en guardar una suspensión de las células a una temperatura por debajo de 0 °C, en estas condiciones su crecimiento se detiene ya que no dispone de agua líquida. Los fenómenos fisicoquímicos que se producen durante la congelación pueden afectar la viabilidad celular, por lo que resulta imprescindible trabajar con un agente crioprotector.⁸

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

1. Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

2. Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37 °C.

3. Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible, lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195 °C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140 °C.

4. Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación.¹⁸

El almacenamiento en nitrógeno líquido ha sido considerado como la mejor y más amplia aplicación técnica de conservación disponible para hongos filamentosos.¹⁹

Se trata de un método seguro y en el mantenimiento de largo plazo de la mayoría de especies de hongos, especialmente los no susceptibles de liofilización, esta técnica de almacenamiento parece superar a todos los demás en la capacidad de preservar las características genómicas y fenotípicas y es, por lo tanto eficaz en la mayor parte de la biodiversidad microbiana, tiene otras varias ventajas importantes: protección contra la contaminación y el ahorro de tiempo, trabajo y espacio.²⁰

Sin embargo, el nitrógeno líquido es muy caro, y el almacenamiento debe ser un lugar ventilado, ya que la constante evaporación del gas podría desplazar el aire y asfixiar a los trabajadores.¹⁹

2.7.3.2 Liofilización

Técnicamente, la liofilización se puede definir como:

1. El enfriamiento de la muestra de líquido, seguido por la conversión de la solución de agua congelable en hielo; cristalización de solutos cristalizables y la

formación de una matriz amorfa que comprende solutos asociados con la humedad no congelada.

2. La sublimación del hielo al vacío.

3. "evaporación" de agua de la matriz amorfa. ²¹

Consiste en someter a sublimación la solución congelada donde se encuentran las células a conservar. Para evitar que las células sufran algún tipo de daño, se requiere el agregado de un agente crioprotector, una vez liofilizadas se puede almacenar a temperatura ambiente. ⁸

La principal ventaja de los cultivos liofilizados en ampollas selladas al vacío es que puede almacenarse fácilmente en un lugar pequeño, no requiere mantenimiento y puede ser enviado sin requisitos especiales, por otra parte, los aislamientos están protegidos de la infección y la infestación. Hoy en día, la liofilización es un método comúnmente utilizados para preservar esporulación de hongos. ¹⁹

Una de las objeciones al proceso de liofilizado es la posible pérdida de ciertas características morfológicas o respuesta fisiológica. Sin embargo, las investigaciones en otras han demostrado que la liofilización es recomendable para el mantenimiento de las bacterias y virus en una determinada fase o estado de virulencia, para mejorar la reproducibilidad de las curvas de ensayo, para la normalización de los inoculantes de leguminosas comerciales, para el mantenimiento de las características fisiológicas de los organismos durante estudios nutricionales a largo plazo y para el mantenimiento de las capacidades biosintéticas de organismos utilizados en la fabricación de antibióticos, ácidos y butilenglicol.

Una segunda objeción es la posibilidad de contaminación del personal, la evidencia se ha obtenido que los microorganismos viables puede estar presente en el vapor retirado de la suspensiones congeladas por la desecación al vacío, un gran número de organismos son liberados en el medio ambiente circundante

cuando las ampollas se abren. Este peligro puede evitarse rodeando el punto de rotura de las ampollas con un algodón empapado de etanol al 70%.⁹

2.7.3.3 Criopreservación

El termino criopreservación se refiere a la preservación de materiales biológicos a temperaturas criogénicas, generalmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hielo seco) o $196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido). Baja temperatura protege las proteínas y la desnaturalización del ADN y el daño y ralentiza el movimiento del agua celular. La preservación de las células a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se recomienda para la conservación a largo plazo.

Conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ es adecuado, pero a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ se considera ideal porque las posibilidades de mutaciones en el ADN son casi cero a esa temperatura. Durante la criopreservación, crioviales se pueden almacenar sumergidos en nitrógeno líquido (a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) o en su fase de vapor (-135 a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$).²²

2.7 Crioprotectores (CPAs)

Una multitud de factores afectan la eficacia de la crioconservación en microorganismos, por ejemplo, la especie, la fase de crecimiento y tasa, temperatura de incubación, composición del medio de crecimiento, pH, osmolaridad y aireación, contenido de agua de la célula, contenido de lípido y composición de las células, densidad de la congelación, composición del medio de congelación, velocidad del enfriamiento, temperatura del almacenamiento y duración del almacenamiento, velocidad de enfriamiento y recuperación del medio. Uno de las condiciones más importantes es la composición del medio que es utilizado para suspender los organismos para la congelación.²³

Se cree que la membrana celular es el sitio primario de la lesión debido a la concentración de la solución y efectos de cristales de hielo que ocurren durante el enfriamiento.²⁴

Es recomendable dejar la suspensión microbiana en contacto con los CPAs permeable por el tiempo que se requiere para equilibrar solutos intracelulares antes de la congelación.²³

Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores: glicerol, dimetilsulfóxido (DSMO), leche descremada e hidratos de carbono (glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc.). La elección del mismo va a depender del tipo de microorganismo a conservar.⁸

Las soluciones de glicerol a una concentración de 10% han demostrado ser útil para la criopreservación de hongos.²⁶

Perlas de poliestireno y los granos de cerámica porosa son empleados para la crioconservación de varias esporas de cultivo de hongo. Las perlas es un aluminosilicato mineral volcánica que retiene grandes cantidades de agua que pueda ser liberada según sea necesario.²⁰

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preservación de cultivos viables, puros y genéticamente estables son requisitos imprescindibles en todo método de conservación para garantizar la reproducibilidad de las investigaciones microbiológicas básicas o aplicadas y en las prácticas de laboratorio de MG II.

La conservación de cepas micóticas por distintos métodos, ha sido una forma efectiva y de gran ayuda para las industrias y laboratorios clínicos para mantener sus cepas de referencia; un requisito esencial para el mantenimiento exitoso de cepas de producción es el sustento íntegro de sus propiedades importantes (por ejemplo, producción de antibióticos, enzimas y otros metabolitos), algunos de los principales usos de estas cepas es para control de calidad microbiano de productos, procesos, equipos, medios de cultivo, reactivos, entre otros.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la U.M.I.E.Z F.E.S. Zaragoza se utilizan cepas micóticas para el desarrollo de microtécnicas; actualmente en el Laboratorio no se cuenta con algún método de conservación, por lo que el propósito de este proyecto es desarrollar un método de conservación de cepas micóticas acorde a las necesidades del laboratorio.

HIPÓTESIS

Se espera establecer las condiciones óptimas del crioprotector, temperatura y de viabilidad para hongos miceliales no patógenos, entonces se podrá utilizar como método de conservación en capilar a mediano plazo.

OBJETIVOS

➤ Objetivo general

Implementar un método de conservación de cepas de hongos miceliales no patógenos, mediante el método de crioconservación en capilar.

➤ Objetivo particular

- Montar la técnica de conservación en capilar
- Conservar por congelación las siguiente cepas: *P. chrysogenum*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*.
- Evaluar la viabilidad de las esporas a temperatura ambiente, 4 °C y -20 °C de las cepas, a los 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días.

MATERIAL

- Mechero Fisher
- Tubos de ensaye de 150 x 16 mm con tapa de rosca estéril. Pyrex
- Gradilla metálica
- Cajas Petri estériles. Pyrex
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Asa micológica
- Jeringa de 5 mL
- Pipetero. Powerpette JENCONS
- Cámara de Neubauer
- Capilares estériles D.O. 1.40-1.60 mm vol. 80µL s/ heparina. LAUKA
- Algodón
- Lápiz punta diamante
- Puntas para micropipetas estériles. BioClean
- Probeta de 100 mL. Pyrex

- Matraz Erlenmeyer 100 mL. Pyrex
- Cubreobjetos
- Varilla de vidrio en forma de “V”
- Portaobjetos

EQUIPO

- Olla de presión. Presto 21 L
- Refrigerador 4 °C. MABE TWIST AIR
- Microscopio electrónico. PRIMO STAR ZEISS
- Balanza digital. Explorer PRO
- Congelador a -20 °C. Tor Rey

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Sabouraud BD BBL

REACTIVOS

- Solución salina inyectable 0.9% Laboratorio PISA
- Leche descremada en polvo marca Svelty
- Solución Alcohol-Yodo. Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. AS
- Glicerol al 10% en agua
- Hipoclorito al 0.1%
- Azul de algodón-lactofenol

CEPAS

- *P. chrysogenum*
- *A. flavus*
- *A. fumigatus*
- *A. niger*

MÉTODO

I. Resiembra de las cepas

- a) De cepas de hongos miceliales ya aisladas e identificadas en tubos con agar inclinado se les realizó la resiembra a un medio inclinado fresco con agar Sabouraud.
- b) Se realizó la resiembra por triplicado y fueron incubados a temperatura ambiente hasta que presentara esporulación abundante.
- c) Una vez que los hongos se desarrollaron se reportó la morfología colonial y se les realizó la técnica de microcultivo para su identificación.

II. Implementación del método de conservación

Ajuste de la carga de esporas mediante el conteo de propágulos en la cámara de Neubauer para cada cepa de hongo.

- a) De los tubos inclinados incubados anteriormente cuya esporulación ya era abundante se le adicionó 1 mL de solución salina inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA), se agitó ligeramente el tubo para desprender las esporas.
- b) Se tomó una pequeña cantidad de la suspensión con la ayuda de la micropipeta para hacer el llenado en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de los propágulos por cuadrante con la ayuda del piano contador de células.
- c) Al final se sumaron los propágulos por cuadrante y el total (n) se ingresó en la siguiente fórmula.

$$N \text{mero de c lulas} = \frac{(n)(10)(20)}{4}$$

$n = n \text{mero de prop gulos en la c mara}$

$10 = \text{volumen por cuadrante}$

$20 = \text{factor de diluci n}$

$4 = n \text{mero de cuadrantes contados}$

- d) De esta forma se conoció el número de propágulos por μL , esta cantidad debería de ser superior a 2000 propágulos por μL .
- e) Se repitió el procedimiento para cada una de las cepas.

III. Estandarización de la carga micótica en el tubo capilar

- a) Se realizó la estandarización en la balanza analítica, se pesó 10 tubos capilares secos y vacíos uno por uno, y se obtuvo la media del peso de los tubos capilares pesados.
- b) Se marcó con tinta indeleble cada tubo capilar en tres partes iguales, se llenó el tubo capilar a una tercera parte con agua destilada y se selló a la flama por ambos extremos, después se volvió a pesar cada uno de los tubos capilares en la balanza.

Este paso nos sirvió para saber aproximadamente el valor en μL de la carga de esporas por tubo capilar.

IV. Preparación y esterilización de la leche descremada Svelty mediante calor húmedo.

- a) Se preparó 50 mL de leche descremada al 15%, se agregó 7.5 g de leche descremada Svelty en polvo en un matraz Erlenmeyer y diluir en 42.5 mL de agua destilada.

b) Se tapó el matraz con una torunda de algodón y se esterilizó el matraz por calor húmedo a 121 °C por 10 minutos a 15 lb de presión.

V. Prueba de la leche descremada como crioprotector

a) Se tomó 0.1 mL de la solución ajustada con una Micropipeta (BioHit Proline) que se colocó en un tubo de ensaye estéril con tapa de rosca.

b) Se adicionó 1.9 mL de la leche descremada estéril.

c) Después se llenaron 60 capilares estériles a su tercera parte de capacidad cerca del mechero en una zona aséptica con la suspensión del paso anterior, se selló a la flama los tubos capilares por ambos extremos.

d) Se colocó 10 tubos capilares en un tubo de ensaye con tapa de rosca, se tapó y se almacenó a temperatura ambiente, se colocó otros 10 tubos capilares en otro tubo de ensaye estéril con tapa de rosca, se tapó y se almacenó a 4 °C y por último se colocó 40 tubos capilares en otro tubo de ensaye con tapa de rosca, se tapó y se almacenó a congelación a -20 °C.

Repetir este procedimiento para cada una de las cepas en estudio.

VI. Prueba de conservación a tres diferentes temperaturas (-20 °C, 4 °C y temperatura ambiente)

a) Se conservó los tubos capilares de cada cepa de hongo a tres diferentes temperaturas, como se especifica en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Conservación de Cepas

Hongo	Crioprotector	Temperatura de conservación	Cantidades de tubos capilares
<i>Aspergillus flavus</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	40
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	40
<i>Aspergillus niger</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	40
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	40

VII. Prueba de viabilidad al tiempo 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días.

La prueba de viabilidad al tiempo 0 se realizó el mismo día en que se llenó y se selló los tubos capilares para corroborar la presencia de los propágulos.

- a. Se limpió los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada de solución alcohol-yodo. Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. AS
- b. Se marcó los extremos del tubo capilar con un lápiz diamante y se rompió por los extremos del tubo con unas pinzas.

- c. Se vació su contenido en dos cajas de Petri diferentes con agar Sabouraud, se incubó a temperatura ambiente.
- d. Se evaluó la morfología colonial después de su crecimiento
- e. Se realizó nuevamente el microcultivo a los 180 días, para observar que la estructuras no se habían modificado.

Nota: se realizó este procedimiento para cada periodo de conservación y para cada una de las cepas de hongos en estudio.

VIII. Técnica tradicional microcultivo

- a) En la base de una caja de Petri de 10 cm de diámetro se colocó una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete).
- b) Sobre la varilla se colocó dos portaobjetos de 76 x 22 mm.
- c) Se esterilizó el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
- d) Se preparó una caja de Petri con agar Sabouraud aproximadamente 5 mm de espesor.
- e) Se cortó el medio en forma de círculos de 15 mm de diámetro con la ayuda de un tubo de ensaye flameado.
- f) Se colocó dos círculos del medio de cultivo en el portaobjeto de la caja de Petri.
- g) Se inoculó en cada uno de los lados del fragmento de media una pequeña porción del hongo a estudiar.
- h) Se colocó el segundo portaobjeto sobre el medio inoculado.
- i) Se le adicionó a la caja 10 mL de agua glicerinada al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo.
- j) Se incubó en la oscuridad durante 7 a 15 días a 25 °C.
- k) Se quitó el agua glicerinada con la ayuda de una jeringa y se le adicionó 10 mL de cloro al 0.1%
- l) Se retiró el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjeto limpio en el que previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.

- m) Se retiró y se desechó el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos, se depositó una gota de azul de algodón en el centro y se colocó un cubreobjetos nuevo.
- n) En caso de querer conservar la preparación durante largo tiempo, se sellan los bordes de los cubreobjetos con barniz de uñas transparente o con resina.

RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la parte práctica del proyecto, al inicio se encuentra el diseño del micrométodo de conservación implementado en el laboratorio. En la tabla 2, 3, 4 y 5 se registran los resultados obtenidos de la prueba de viabilidad realizada a cada una de las cuatro cepas durante 180 días de conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y temperatura ambiente, seguida de las fotografías tomadas de la técnica de microcultivo de cada cepa.



Fotografía 1. A la izquierda, tubos capilares más las esporas con el crioprotector sellado a la flama y a la derecha tubos capilares almacenados en tubo con tapa de rosca etiquetada para su almacenamiento.

Cuadro 2. Viabilidad de *A. flavus*

Tiempo (días)	<i>A. flavus</i>					
	Temperatura ambiente		Refrigeración 4 °C		Congelación -20 °C	
	0	+	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
15	-	-	+	+	+	+
30	-	-	+	+	+	+
60			+	+	+	+
90			-	-	+	+
120			-	+	+	+
150			-	+	+	+
180			-	-	+	+

(+) Crecimiento, (-) sin crecimiento

Cuadro 3. Viabilidad de *A. niger*

Tiempo (días)	<i>A. niger</i>					
	Temperatura ambiente		Refrigeración 4 °C		Congelación -20 °C	
	0					
7	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+	+
90	-	-	+	+	+	+
120	-	-	+	+	+	+
150	-	-	+	+	+	+
180			-	-	+	+

(+) Crecimiento, (-) sin crecimiento

Cuadro 4. Viabilidad de *A. fumigatus*

<i>A. fumigatus</i>						
Tiempo (días)	Temperatura ambiente		Refrigeración 4 °C		Congelación -20 °C	
	0	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+	+
90	-	+	+	+	+	+
120	-	+	+	+	+	+
150	-	+	+	+	+	+
180	+	+	+	+	+	+

(+) Crecimiento, (-) sin crecimiento

Cuadro 5. Viabilidad de *P. chrysogenum*

<i>P. chrysogenum</i>						
Tiempo (días)	Temperatura ambiente		Refrigeración 4 °C		Congelación -20 °C	
	0	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+
90	-	-	+	+	+	+
120	-	-	+	+	+	+
150	-	-	-	-	-	+
180	-	-	+	+	+	+

(+) Crecimiento, (-) sin crecimiento

Observación microscópica

Cuadro 6. Microcultivo realizadas de cada cepa vista al microscopio a 40X con azul de algodón a los 180 días





<p><i>A. niger</i></p>	<p><i>A.fumigatus</i></p>
	
<p><i>A. flavus</i></p>	<p><i>P.chrysogenum</i></p>
	



Figura 1. *A. flavus* viabilidad al tiempo cero



Figura 1.1. Viabilidad a los 180 días de *A. flavus*, capilar en refrigeración en agar Sabouraud



Figura 1.2 Viabilidad a los 180 días de *A. flavus*, capilar en congelación en agar sabouraud

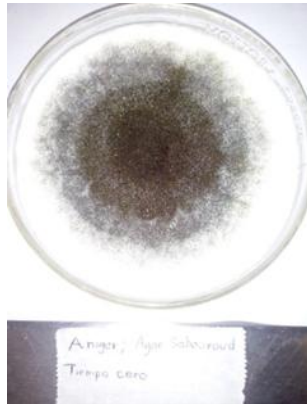


Figura 2. *A. niger*. Viabilidad al tiempo cero



Figura 2.1. Viabilidad a los 180 días de *A. niger*, capilar en refrigeración en agar Sabouraud



Figura 2.2. Viabilidad a los 180 días de *A. niger*, capilar en congelación en agar Sabouraud



Figura 3. *A. fumigatus*. Viabilidad al tiempo cero



Figura 3.1. Viabilidad de *A. fumigatus* a los 180 días, capilar a temperatura ambiente en agar Sabouraud

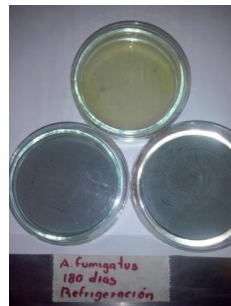


Figura 3.2. Viabilidad de *A. fumigatus* a los 180 días, capilar en refrigeración en agar Sabouraud



Figura 3.3. Viabilidad de *A. fumigatus* a los 180 días, capilar en congelación en agar Sabouraud



Figura 4. *P. chrysogenum*. Viabilidad al tiempo cero

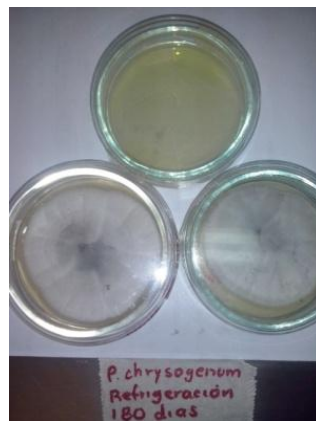


Figura 4.1. Viabilidad de *P. chrysogenum* a los 180 días, capilar en refrigeración en agar Sabouraud

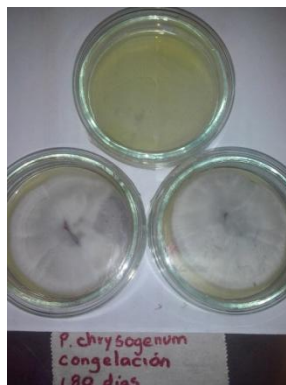


Figura 4.2. Viabilidad de *P. chrysogenum* a los 180 días, capilar en congelación en agar Sabouraud.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado analizaremos los resultados obtenidos del microcultivo y de la viabilidad así como la morfología macroscópica de cada una de las cepas.

Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad se realizó durante 180 días de conservación a tres diferentes temperaturas a cada una de las cepas vaciando directamente el contenido de cada capilar en cajas de Petri con agar Sabouraud.

La viabilidad al tiempo cero, que se realiza el mismo día que se sellan los capilares, éstas creció ya que los progámulos estaban presentes, se realizó para corroborar la presencia de las esporas en la suspensión además de realizar su conteo en la cámara de Neubauer para establecer la cantidad de propágulos presente.

Para *A. flavus* la temperatura a la que mejor se conserva es la de congelación ya que a los 180 días en ambas cajas inoculadas el hongo se encuentra viable sin cambio en su morfología macroscópica y microscópica. En cuanto a la temperatura de refrigeración la viabilidad fue decayendo, a partir de los 90 días de evaluación en ninguna de las dos cajas sembradas creció el hongo, se siguió evaluando el hongo a los 120 y 150 días lo cual hubo crecimiento en una de las dos cajas sembradas, sin embargo a los 180 días de conservación no hay crecimiento. En la de temperatura ambiente dejó de crecer a los 7 días después de su sellado en capilar, la evaluación se continuó a los 15 y a los 30 días para confirmar su viabilidad, con lo cual ninguna de estas cajas sembradas volvió a crecer.

En cuanto *A. niger* los capilares a temperatura ambiente empezó a variar la viabilidad a partir de los 60 días y ya para los 90 días dejó de crecer, se siguió evaluando la viabilidad en los días posteriores para corroborar la misma. Los de temperatura de refrigeración tuvo un buen crecimiento solo que al final en la última

evaluación (180 días) dejó de crecer el hongo, la de temperatura de congelación en los 180 días de su evaluación de la viabilidad estas seguían viables sin cambio alguno. En cuanto a *A. fumigatus* tanto para la temperatura de refrigeración y congelación siguió creciendo hasta los 180 días de su evaluación de la viabilidad sin cambio en su morfología, la de temperatura ambiente empezó a variar la viabilidad a partir de los 15 días después de su sellado, esta se siguió evaluando en los días posteriores y ya para los 180 días esta seguía viable.

En tanto para *P. chrysogenum* a los 120 días la de congelación y refrigeración estuvieron viables, ya en los 150 días la de congelación dejó de crecer unas de las cajas en donde fue sembrado lo cual nos indicaba variación en su viabilidad, a los 180 días seguían viables ambas temperaturas. La de temperatura ambiente dejó de crecer a los 90 días y se siguió evaluando a los 120 días posteriores lo cual ya no presentó crecimiento, esto es debido a que los propágulos al estar a temperatura ambiente favorece un metabolismo activo dentro del capilar y el crioprotector proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo, con el paso del tiempo se terminan los nutrientes y la viabilidad de los propágulos empiezan a decaer por lo que al momento de sembrarlas en agar dichos propágulos ya están muertas y por lo tanto ya no hay crecimiento.

Uno de los factores que afecta a la viabilidad es la temperatura, la de congelación afecta a nuestras células durante la congelación por la formación de cristales de hielo que provoca la ruptura de la membrana y la muerte de las células, de ahí que es indispensable trabajar con un agente crioprotector, que en este caso fue nuestra leche descremada.

Otro factor importante es la osmolaridad, la concentración del crioprotector es de suma importancia, por la cantidad de solutos presentes en la misma, así generar un equilibrio de solutos intracelulares y evitar la muerte de las células.

El tiempo de almacenamiento es otro factor que afecta a la viabilidad de las células, a pesar de que las de temperatura de congelación y/o refrigeración las

células tengan un metabolismo más lento eso no implica que sigan desarrollándose y por lo tanto su muerte celular.

Observación microscópica

Después de realizar el microcultivo se observaron las estructuras fúngicas que no estuvieran dañadas después del almacenamiento. Para el *A. niger* la formación de conidias en un extremo es abundante, al punto que las vesículas se encuentran ocultas por densos agregados de conidias negras, vesícula redonda de donde nace alrededor en un ángulo de caso 360° las fiálides, en tanto para la observación de *A. fumigatus* cabezas aspergilaes con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula y las conidias son incoloras.

Los conidióforos para *A. flavus* son largos, las fiálides se originan de todo el perímetro de la superficie de la vesícula Las conidias son esféricas y forman cadenas relativamente largas. *P. chrisogenum* presenta conidióforos redondos triverticilados (fiálides que nacen desde métulas), ramificado al final con métulas y fiálides en forma cilíndrica, donde nacen conidios subglobosos.

CONCLUSIÓN

Para el primer objetivo particular, se montó la técnica de conservación en capilar empleando leche descremada al 15% como agente crioprotector lo cual fue todo un éxito.

Con relación al segundo objetivo particular, después de probar varias temperaturas se determinó que el mejor método de conservación para las cepas *P. chrysogenum*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* fue la de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con las otras temperaturas ya que a esta temperatura la viabilidad prevaleció hasta los 180 días de la evaluación.

Para el tercer objetivo se evaluó la viabilidad de las esporas por el periodo establecido de 180 días, de acuerdo a la temperatura almacenamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos la temperatura de congelación resultó ser el mejor método de almacenamiento para nuestras esporas de *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* ya que de los días evaluados estos siguieron viables a excepción de *P. chrysogenum* que solo fue viable a los 150 días y como segunda alternativa la temperatura de refrigeración esta mantiene viable a las esporas. Además de que nuestro método de conservación ahorra material, es sencillo y requiere poco espacio de almacenamiento.

PROPUESTAS

- Realizar el método para otras especies de hongos
- Continuar evaluando la viabilidad de las cepas conservadas en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada tres meses para determinar el tiempo máximo de conservación de los hongos.

REFERENCIAS

1. Bonifaz J. Micología médica básica. 4ta ed. McGrawHill;
2. Arenas R. Micología medica ilustrada. 4ta ed. México: McGrawHill; 2011.
3. Hernández M, Monter N. Implantación a Microescala para determinar las características fisiológicas de hongos miceliales y levaduras en el laboratorio de microbiología general II de la carrera de QFB de la FES Zaragoza UNAM [tesis Lic.]. México: UNAM; 2013.
4. López R, Méndez L, Hernández F, Olivares L. Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 3ra ed. México: Trillas; 2012.
5. Willey J, Sherwood L, Woolverton C. Microbiologia de Prescott, Hrley y Klein. 7ma ed. España: McGrawHill; 2008.
6. Konema E, Allen S, Janda W, Schereckenberger P, Winn W. Diagnostico Microbiologico: texto y atlas color. 5ta edición. Argentina: Panamericana; 1999.
7. Acompa L, Marques M, Mora J. Atlas electrónico de hongos contaminantes. [CD-ROM]. PAPIME PE200210; 2012.
8. Rico M, Piattoni C, González C, Monela R, Latorre M, Lurá M. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. FABICIB [internet]. 2004 [cited 2014 Dec 12]; 8: 163-172. Disponible en ScienceDirect
9. Fennell D. Conservation of fungous cultures. The Botanical Review. [Internet].1960 [cited 2014 Dec 12]; 26 (1): 79-141. Disponible en: ScienceDirect
10. Xiaoja H, Gordon W, Lihua X, Changbing Y, Yinshui L, Xing L. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. Journal of Microbiological Methods. [Internet] 2014; 99: 81- 83. Disponible en: ScienceDirect

11. Fong k, Anuar S, Lim P, Tham F, Sanderson F. R. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*. 2000; 14(3): 127-130. Disponible en: ScienceDirect
12. García M, Rocha L, Valdez N, Trujillo M. Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* in sterile distilled water. *MethodsX*. [Internet]. 2014; 18-22. Disponible en: ScienceDirect
13. Rhodes M. Preservation of yeasts and fungi by desiccation. *National collection of type cultures*. 1948; 35-39.
14. Garcia M, Lopez J, Lopez L, Uruburu F. Preservation of microbial strains in the wine industry. *Molecular wine microbiology*. 2011; 303-318.
15. Smith D, Onions A. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Mycology Soc*. 1938; 81 (3): 535-540.
16. Kumar V, Tuohy M. *Laboratory protocols in fungal biology* [internet]. India: Springer; 2013 [cita 2015 Jan 9]; 609 p. <http://www.springer.com/series/11224>
17. Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes-Recent methods. *British Mycological Society*. 2014; 118: 107-125.
18. García E. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas [tesis Lic.]. México: UNAM; 2013.
19. Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginero M, Declerck S, et al. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *BMS promoting fungal science*. 2009; 1027-1038.
20. Homolka L, Lisá I, Eichlerová I, Nerud F. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *J Mic Meth*. 2001; 47: 307-313
21. Stacey G, Day J. *Cryopreservation and Freeze-Drying protocols* [internet]. Totowa, New Jersey. Humana Press; 2007 [cita 2015 Jan 9]; 342 p. Disponible en: <http://histemb.medicine.ankara.edu.tr/Cryopreservation%20and%20Freeze-Drying%20Protocols.pdf>
22. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche Y. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology letters*. 2013; 339: 1-9

23. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46: 205-229.
24. Smith D. Cryoprotectants the cryopreservation of fungi. Notes and brief articles [internet]. 1983; 80(2): 360-363.
25. Welsch U. *Histología*. 2da ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2010. p.688
26. Gil P. *Cultivo de Células Animales y Humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. España: Editorial Visión Libros; 2011. P.400
27. *Técnicas y métodos hematológicos básicos*. Elsevier España, S.L. 2010: 275.
28. López R, Méndez L, Hernández F, Castañon R. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. México: Editorial Trillas; 1995.
29. Martínez R, Méndez L, Hernández F. *Micología Medica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. México: Editorial Trillas; 1995. p.193
30. Vilata J. *Micosis cutánea*. España: Editorial Medica Panamericana; 2006. p. 200

ANEXO

Microscopio óptico

Funciona con una fuente de luminosa eléctrica cuyos rayos iluminan y atraviesan el preparado desde abajo. El microscopio óptico o microscopio de luz tiene un límite de resolución de aproximadamente $0.3 \mu\text{m}$ (en la practica un aumento de alrededor de 1000 veces) con lo cual puede identificarse bien células y bacterias. El límite de resolución depende de la longitud de la luz, los órdenes de magnitud habituales de la microscopia óptica oscilan entre unos pocos milímetros y algunos micrómetros.

Un microscopio óptico en esencia está compuesto por una fuente luminosa incorporada en el pie del microscopio, cuya luz atraviesa el preparado y el sistema de lentes del microscopio, un sistema de lentes condensador, una platina sobre la cual se coloca el material observar; objetivos (en la mayoría de los casos tres o cuatro, ubicados en un dispositivo que rota para colocarlos uno a la vez en el paso de los rayos) y un ocular, el ocular está en la parte superior del microscopio, por donde se mira, el aumento de este es en la mayoría es de $10\times$.²⁷

Cámara de Neubauer

Se trata del clásico hemocitómetro que se utiliza en el laboratorio de análisis clínico para realizar recuento de la serie blanca y roja de la sangre. Sobre la cámara se coloca un cubreobjetos y se carga una gota de la suspensión celular en el borde del cubreobjetos. La suspensión entra en la cámara de recuento por capilaridad bajo el cubreobjetos. La suspensión sobrante cae en los canales excavado en la cámara que están a lado de las cámaras de recuento. En cada cámara de recuento existe un retículo grabado en el vidrio que contiene una cuadrícula de recuento con dos tipo de cuadros de los cuales, en cultivo celulares se utilizan los más grandes para contar células nucleadas, los más pequeños se utilizan en hematología para contar glóbulos rojos.

Para conocer la concentración de células en suspensión se cuentan las que hay en los 16 cuadrados de cada una de las cuatro cuadrículas. Conociendo las dimensiones de cada uno de los cuadrados (0.25 mm de lado) y la profundidad de la cámara de recuento (0.1 mm) se sabe que el volumen de muestra por cada 16 cuadrados es de 0.1 μ l. Así siendo “n” el número de células total en los 64 cuadrados contados, la concentración celular de la muestra sería: ²⁸

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{mm}^3} = \frac{n}{4 * 1000}$$

La cámara de Neubauer cuya distancia entre el cubreobjetos y la base de la cuadrícula es de 0,1 mm. La cuadrícula es un cuadrado de 3 mm de lado, divididos a su vez en 16 cuadrados de 0,25 mm de lado. El cuadro central se divide en 400 cuadrados pequeños de 0,05 mm de lado. El volumen total de la cámara de Neubauer es de 0,9 $\text{mm}^3 = 0,9 \mu\text{L}$, y el volumen de cada uno de los nueve cuadrados de 1mm de lado es de 0,1 $\text{mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$. ²⁹

Microcultivo

Cultivo en portaobjetos

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de los *Hyphomycetes* y algunos *Oomycetes*, se puede emplear para:

- I. Identificación taxonómica de hongos
- II. Estudios de ontogenia de los conidios
- III. Obtención de material para microfotografías y micrografía electrónica
- IV. Elaboración de preparaciones permanentes útiles en la enseñanza
- V. Como apoyo para identificaciones diferenciales
- VI. Como control para las cepas de colecciones de hongos

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo del hongo por procesar y los que se persiguen al realizar la técnica. En general puede decirse que los medios de cultivo más empleados son: agar papa dextrosa, agar Borelli, agar Sabouraud simple, extracto de malta y medio de Czapek; el tiempo de incubación normalmente es de 7 a 15 días y la temperatura habitual es de 25 °C.

Técnica tradicional

1. En la base de una caja de Petri de 10 cm de diámetro se coloca una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete).
2. Sobre la varilla se fija un portaobjetos de 76 x 22 mm, se deposita en la misma caja un cubreobjetos de 22 x 22 mm.
3. Se esteriliza el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
4. Se prepara una caja de Petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor.
5. Se corta el medio en cuadros de 10 mm por lado con ayuda de un bisturí estéril.
6. Se coloca un cuadro del medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de Petri.
7. Se inocula en cada uno de los lados del fragmento del medio de cultivo una pequeña porción del hongo a estudiar.

8. Se coloca el cubreobjeto sobre el medio inoculado.
9. Se adiciona a la caja 10 mL de agua glicerinada al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo.
10. Se incuba en la oscuridad durante 7 a 15 días a 25 °C.
11. Se retira el cubreobjetos y se coloca sobre un portaobjeto limpio en el que previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.
12. Se retira y desecha el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos, se deposita una gota de azul de algodón en el centro y se coloca un cubreobjetos nuevo.
13. En caso de querer conservar la preparación durante largo tiempo, se sellan los bordes de los cubreobjetos con barniz de uña transparente o con resina.

30

Tinción con azul de algodón de lactofenol

Es útil para realizar el examen directo de cultivos ya que es una técnica rápida que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjeto y sobre ella colocar un fragmento pequeños del cultivo a estudiar, dilacerándolo perfectamente para poder una buena observación, se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se procede a la conservación de la misma.

Esta técnica de coloración se puede aplicar a los microcultivos, en los cuales solo será necesario aplicar una gota del colorante entre el porta y el cubreobjetos con el hongo. Con esta técnica también se puede teñir preparaciones para conservación a largo plazo, para esto es necesario sellar los bordes de la preparación con barniz de uñas transparente.³¹

Formula del colorante:

- Ácido Láctico 20 g
- Glicerina 40 g
- Fenol en cristales 20 g
- Azul de algodón (1%) 2 ml
- Agua destilada 20 ml³²