



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**Implementación de un Método de Conservación en Capilar para
Hongos Levaduriformes**

TESIS

**Para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo**

PRESENTA:

RODEA HERNÁNDEZ CARLOS ALBERTO

DIRECTORA: Mtra. Yolanda Flores Cabrera.

ASESORA: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Bioquímica Clínica

Lugar de desarrollo:

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

Éste trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME PE202716

CIUDAD DE MÉXICO. 2017



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.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
3.- MARCO TEÓRICO	4
3.1.- HONGOS	4
3.1.1- Hongos Levaduriformes	5
3.2.- MÈTODOS DE CONSERVACIÒN	5
3.2.1.- MÈTODOS DE CONSERVACIÒN A CORTO PLAZO	6
3.2.1.1.- Resiembra Periódica	6
3.2.1.2.- Tubos con Agar Inclinado Cubiertos con Aceite	7
3.2.1.3.- Cultivos Profundos en Agar	9
3.2.2.- MÈTODOS DE CONSERVACIÒN A MEDIANO PLAZO	10
3.2.2.1.- Cultivos en Arena o Tierra Estéril	10
3.2.2.2.- Conservación por Suspensión en Agua Estéril	11
3.2.2.3- Secado	12
3.2.2.4.- Deseccación en Papel de Filtro	13
3.2.2.5- Deseccación en Bolitas de Alginato	13
3.2.3.- MÈTODOS DE CONSERVACIÒN A LARGO PLAZO	14
3.2.3.1.- Conservación por Congelación	15
3.2.3.2.- Criopreservación	17
3.2.3.3.- Liofilización ó Freeze – Drying	18
3.3.- Agentes Crioprotectores	20
3.4.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS LEVADURIFORMES	22

3.4.1.- <i>Candida krusei</i> _____	22
3.4.2.- <i>Candida glabrata</i> _____	23
3.4.3.- <i>Candida stellatoidea</i> _____	24
3.4.4.- <i>Candida albicans</i> _____	24
3.4.5.- <i>Candida tropicalis</i> _____	25
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	26
5.- HIPÓTESIS _____	27
6.- OBJETIVO GENERAL _____	27
6.1.- OBJETIVO ESPECÍFICO _____	27
7.- MATERIAL _____	28
7.1.- EQUIPO _____	28
7.2.- MEDIOS DE CULTIVO _____	29
7.3.- REACTIVOS _____	29
7.4.- CEPAS _____	29
8.- MÉTODO _____	30
I. Identificación de los hongos levaduriformes _____	31
II. Propuesta del Método de Conservación _____	31
III. Ajuste de la concentración y esterilización de leche descremada Svelty mediante calor húmedo a presión _____	32
IV. Prueba como crioprotector de la leche descremada _____	33
V. Prueba de conservación a -20° C _____	33
VI. Prueba de viabilidad al tiempo 0, 15, 30 ,60 y 90 días _____	34
9.- DISEÑO EXPERIMENTAL _____	35
9.3.- VARIABLES _____	35
10.- RESULTADOS _____	36
10.1.- Caracterización de las distintas especies del género <i>Candida</i> por medio de zimograma _____	36

10.2.- Método de conservación implementado en el laboratorio_____	39
10.3.- Pruebas de viabilidad y resultados de zimogramas realizados a las distintas levaduras durante los 90 días de conservación_____	40
10.4.- <i>Candida krusei</i>_____	40
10.4.1.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 0_____	40
10.4.2.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 15_____	41
10.4.3.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 30_____	42
10.4.4.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 60_____	43
10.4.5.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 90_____	44
10.5.- <i>Candida glabrata</i>_____	45
10.5.1.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 0_____	45
10.5.2.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 15_____	46
10.5.3.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 30_____	47
10.5.4.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 60_____	48
10.5.5.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 90_____	49
10.6.- <i>Candida stellatoidea</i>_____	50
10.6.1.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 0_____	50
10.6.2.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 15_____	51
10.6.3.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 30_____	52
10.6.4.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 60_____	53
10.6.5.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 90_____	54
10.7.- <i>Candida albicans</i>_____	55
10.7.1.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 0_____	55
10.7.2.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 15_____	56
10.7.3.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 30_____	57
10.7.4.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 60_____	58
10.7.5.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 90_____	59
10.8.- <i>Candida tropicalis</i>_____	60
10.8.1.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 0_____	60

10.8.2.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 15	61
10.8.3.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 30	62
10.8.4.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 60	63
10.8.5.- Prueba de viabilidad y fermentación al día 90	64
11.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	65
11.1.- Caracterización de las levaduras	65
11.2.- Prueba de viabilidad	66
11.3.- Prueba de zimograma	67
11.4.- Comparación con el Método de Conservación Empleado a Hongos Filamentosos	68
12.- CONCLUSIONES	69
13.- REFERENCIAS	70

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme permanecer a la máxima casa de estudios de América Latina y por ser mi segunda casa.

A la Escuela Nacional Preparatoria no 4 “Vidal Castañeda y Nájera” por iniciarme en esta bella etapa de mi vida académica.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a mis maestros que me brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante.

A mi directora de tesis y mi asesor de tesis:

La Mtra. Yolanda Flores Cabrera y el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis y por ser un ejemplo para toda la comunidad universitaria.

A mis sinodales de tesis:

La maestra Georgina Guadalupe Bermejo Torres, el maestro José Óscar González Moreno y el maestro Manuel Orduña Sánchez por toda su amabilidad, compromiso, paciencia y el tiempo que me brindaron para poder concluir y mejorar este trabajo y también por permitirme tener el honor de formar parte de esto.

Y por último y no menos importantes al Dr. Rubén Marroquín Segura y al maestro Armando Ramírez González por ser personas humildes, sencillas, de buen corazón, por permitirme formar un lazo de amistad, por todo el apoyo otorgado y por hacer agradable la estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS

A mi madre Margarita Hernández por ser la razón de levantarme y esforzarme por el presente y el mañana, mi gratitud sola no basta para demostrarle que todos sus esfuerzos no han sido en vano, ver el esfuerzo que hace a diario me hace sentir un ser muy afortunado, agradezco que esté en mi vida.

A mi padre Francisco Javier Rodea por compartirme todas sus experiencias y consejos, los cuales me han servido de mucho en la vida y en seguir un buen camino, tan fácil que suena decirlo, se escucha tan simple y trillado, pero la gratitud que siento es muy grande.

A mis hermanos: Luis Daniel, Rosario y Jesús por permitirme aprender más de la vida y mostrarme el camino hacia la superación. Gracias por no solo ayudarme en gran manera a concluir el desarrollo de mi formación, sino por todos los momentos que pasamos en el proceso.

A Sofía con quien estoy agradecido por su desinteresada ayuda, por apoyarme cuando lo necesite, por aportar considerablemente en mi proyecto. Le agradezco no solo la ayuda brindada, sino por los buenos momentos en los que convivimos.

Y para finalizar también agradezco a todos mis amigos y maestros con los que forme un lazo muy fuerte, ya que gracias a su amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

...No te ríndas, aun estas a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Acepta tus sombras,
Enterrar tus miedos,
Liberar el lastre. Retomar el vuelo.

No te ríndas que la vida es eso,
Continuar el viaje, perseguir tus sueños,
Desterrar el tiempo,
Correr los escombros, y destapar el cielo.

No te ríndas, por favor no cedas,
Aunque el frío quemé,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se ponga y se calle el viento
Aún hay fuego en tu alma,
Aún hay vida en tus sueños

Porque cada día es un comienzo nuevo,
Porque esta es la hora
Y el mejor momento...

(Mario Benedetti)

1.- RESUMEN

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología. Por eso es necesario conservar esa fuente microbiana y esto se realiza mediante los diversos métodos de conservación, de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables. El método de conservación que se elija debe de garantizar la viabilidad de al menos un 70% de la carga micótica, la pureza y la estabilidad de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación. Estos métodos se resumen en tres categorías, dependiendo del tiempo en que se mantienen viables; a corto plazo (15 a 20 días); mediano plazo (2 a 5 años) y largo plazo (más de 5 años). La elección del método de conservación dependerá del tipo de microorganismo que se pretende conservar, del período de conservación que se requiere y de los recursos con los que cuente el laboratorio. Actualmente se usan diversos agentes crioprotectores, los cuales reducen la formación intracelular de cristales de hielo y reducen el potencial de daño osmótico durante el congelamiento y el descongelamiento, siendo de gran ayuda para los métodos de conservación a bajas temperaturas. En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z) se utilizan cepas fúngicas para el desarrollo de microtécnicas, actualmente en el laboratorio no se cuenta con algún método de conservación para hongos levaduriformes, por lo cual el propósito de este proyecto fue implementar un método de conservación acorde a las necesidades del laboratorio, como resultado del proyecto se logró implementar un método capaz mantener la viabilidad y las características bioquímicas de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. albicans* y *C. tropicalis* durante 90 días a una temperatura de conservación de -20 °C, implementar este método de conservación a distintos microorganismos podrá reducir costos y espacio de almacenamiento.

2.- INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de antibióticos, vitaminas y aminoácidos; elaboración de pan, queso, leche, bebidas y licores; fabricación de disolventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación. El conocimiento de las peculiaridades de los diferentes métodos de preservación existentes para su correcta aplicación, así como el seguimiento continuo de las propiedades de las cepas, propician su empleo como inóculo confiable en la industrias, docencia y en la investigación.

Con frecuencia la elección del método más adecuado para conservar cultivos microbianos resulta difícil, pues deben tomarse en consideración los criterios de viabilidad y pureza de las cepas, cambios poblacionales y genéticos, número y valor de los cultivos, costo, suministro y transporte de cepas, así como la frecuencia del uso de los cultivos.

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un periodo considerable de tiempo, de tal forma que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los cambios genéticos. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable.

En relación con el número y valor de los cultivos, debe considerarse el tiempo a emplear en preservación inicial, manipulación y control periódico de las cepas, el espacio de almacenamiento disponible y su importancia, al ser empleada en su mayoría como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica.

En el laboratorio de Microbiología e Inmunología de la UMIEZ FES Zaragoza actualmente no se cuenta con un método de conservación de cepas micóticas (hongos levaduriformes) 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

3.1.- 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. 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).^{1, 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. Los hongos unicelulares

están representados por las levaduras y los multicelulares por los hongos filamentosos.³

3.1.1.- Hongos Levaduriformes

Las levaduras (hongos levaduriformes) son hongos unicelulares no filamentosos con una forma esférica u oval típica. Como los hongos filamentosos, las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza; con frecuencia se las encuentra como una cubierta pulverulenta blanca en las frutas y las hojas.

Las levaduras pueden crecer como anaerobios facultativos. Pueden utilizar el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor final de electrones; éste es un atributo valioso porque permite que estos hongos sobrevivan en diversos ambientes. Si tiene acceso al oxígeno las levaduras llevan a cabo la respiración aeróbica para metabolizar los hidratos de carbono a dióxido de carbono y agua; en ausencia de oxígeno fermentan los hidratos de carbono y producen etanol y dióxido de carbono.⁴

3.2.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Diversos métodos se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos, cumpliendo con tres objetivos importantes para lograr conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología, los cuales son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan

contaminaciones durante el proceso de conservación; conseguir que al menos el 70-80% de las células se mantengan viables durante este periodo, y por último, que éstas células permanezcan genéticamente estables.^{5, 6, 7, 8, 9} Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método de conservación, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando al menos dos de estos métodos. Estos métodos se pueden resumir agrupándolos en tres categorías en las que se agrupan los métodos de conservación dependiendo del tiempo en que permanecen viables las células conservadas, los cuales son: a corto plazo, mediano plazo y métodos de elección o conservación a largo plazo.^{5, 6, 7, 10}

3.2.1.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO

Estos métodos ayudan al mantenimiento de cepas, generalmente donde se requiera la cepa activa.¹¹

3.2.1.1.- Resiembra Periódica

Los cultivos por este método deben de ser mantenidos por duplicado, uno de los tubos constituye el cultivo de trabajo y el otro es un cultivo de reserva que va a ser utilizado sólo si el primer tubo es inutilizado por contaminación o por pérdida de viabilidad.¹²

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer

indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando la muerte celular, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Este método no es recomendable para conseguir la estabilidad genética, y las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los períodos entre dos resiembras. Otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo.⁶

La técnica de transferencia periódica tiene la ventaja de hacer cultivos inmediatamente disponibles para la comparación, pero sigue siendo la técnica más laboriosa de todos los métodos. Este método es simple y barato en términos del equipamiento necesario.¹² Otras objeciones a esta técnica se pueden vencer en gran medida a través de una cuidadosa selección de un adecuado sustrato y la protección contra la infestación por ácaros.¹³

3.2.1.2.- Tubos con Agar Inclinado Cubiertos con 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 el 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.¹⁴ Generalmente el cultivo debe de encontrarse en condiciones óptimas de crecimiento micelial y esporulación.¹¹

Los tubos deben de ser llenados con agar a 1/3 de su capacidad y dejados enfriar en posición inclinada antes de ser inoculados, una vez inoculados e incubados se cubren con aceite mineral (parafina de densidad 0.869 a 0.890) esterilizado en horno a 170 °C por 1 a 2 horas, o en autoclave a 121 °C durante 15 minutos dos veces. Los tubos deben de ser guardados en posición vertical de preferencia a 5 °C.¹²

Este método actúa mediante la prevención de la deshidratación, la disminución de la actividad metabólica y el crecimiento a través del consumo reducido de oxígeno, para los hongos, éste método se emplea para aquellos a los que no se les puede aplicar el método de liofilizado.⁹

El consumo de oxígeno de un cultivo de hongos sumergido 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 tóxico 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 la comparación. El método tiene la desventaja de que los tubos deben ser almacenados en posición vertical en todo momento.^{13, 15}

3.2.1.3.- Cultivos Profundos en Agar

Este es un método adecuado para el mantenimiento de microorganismos anaerobios los cuales han sido aislados de suelo; con un asa bacteriológica recta esterilizada se toma la cantidad de inóculo, se introduce en el fondo del medio sólido de forma vertical y se retira en la misma dirección por donde se introdujo, si el cultivo se hace en medio líquido con un asa bacteriológica curva esterilizada se toma la cantidad de inóculo, se introduce en el centro del medio líquido, agitándose sin tocar las paredes del tubo, las condiciones de incubación y almacenamiento dependerán del tipo de microorganismo.^{10, 16, 17}

3.2.2.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO

A mediano plazo, es el término que agrupa los métodos con los que se logra mantener la viabilidad de los cultivos entre dos y cinco años.¹⁰ Se destacan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena o tierra estéril, sílica gel, perlas de vidrio, esferas de plástico o papel filtro) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible.^{7, 18, 19, 20} Así como el almacenamiento en suelo estéril, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar).¹⁰

3.2.2.1.- Cultivos en Arena o Tierra Estéril

Las técnicas 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 no permite crecimiento y preservaría sólo los conidios introducidos en el suelo y la segunda, 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 reemplazar la tierra del jardín. La comparación de estos materiales como medios de almacenamiento generalmente ha demostrado que la arcilla o arena son los más satisfactorios.

Las ventajas del método de cultivo del suelo de conservación se pueden resumir de la siguiente manera:

- a) Por lo general se incrementa sustancialmente la longevidad de los cultivos.
- b) Los cambios morfológicos se reducen o se eliminan.
- c) El inóculo uniforme está disponible durante largos periodos si se cuida bien en el manejo de los cultivos. Sin embargo, es imposible observar las características de crecimiento de los organismos o para detectar la contaminación.¹³

Los microorganismos productores de esporas pueden conservarse durante largos períodos utilizando este método.^{15, 18}

3.2.2.2- Conservación por Suspensión en Agua Estéril

Este método fue descrito originalmente por Castellani en 1939, actualmente es muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en especies de *Phytophthora sp*, *Pythium sp*, ascomicetos, basidiomicetos y hongos mitospóricos, alcanzando viabilidades entre dos y siete años. Consiste en cultivar al microorganismo en medio líquido y después de concentrar por centrifugación se resuspende en un volumen igual de agua. La estabilidad para características morfológicas y fisiológicas es

buena, pero no se ha comprobado para características específicas como la virulencia, el poder fermentativo, etc.^{11, 21}

3.2.2.3.- Secado

Los métodos de secado se basan en la eliminación de la mayor cantidad de agua 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.¹⁴

Los cultivos para secado se siembran 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.²²

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 los mejores materiales de protección.
- d) El tamaño de la muestra afecta la viabilidad.

e) El secado de cultivos sobreviven por más tiempo en refrigeración que a temperatura ambiente.^{13, 15}

3.2.2.4.- Desección en Papel de Filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann n° 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células.^{9, 18, 19, 20}

3.2.2.5.- Desección en Bolitas de Alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4 °C y 18 °C, pudiéndose

guardar incluso a -80 °C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales.^{20, 21, 22, 24}

3.2.3.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO.

En esta categoría se ubican los métodos de congelación (a -70 °C y -196 °C) y la liofilización,^{10, 18, 19, 20} como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos (cultivos de hongos, bacterias, levaduras, algas, suero, células sanguíneas, entre otros) y que sean reconocidas como técnicas de elección.⁹

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto, así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo.^{4, 5, 10, 11,}

16

Se emplea fundamentalmente cuando se desea mantener las cepas por periodos de tiempo prolongados.^{5, 14, 15} 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.²⁵ En la actualidad, además de la liofilización, la criopreservación parece ser la mejor técnica de conservación disponible para hongos filamentosos.^{15, 24}

3.2.3.1- Conservación por 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 liofilización.^{15, 26}

La congelación consiste en guardar una suspensión de las células a una temperatura por debajo de 0 °C, con el congelamiento no queda agua disponible permitiendo una reducción total o parcial de su metabolismo, con ello se detiene el crecimiento.¹² Los fenómenos fisicoquímicos que se producen durante la congelación pueden afectar la viabilidad celular, por lo que resulta imprescindible trabajar con un agente crioprotector.^{14, 15}

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

a) 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.^{10, 11, 15, 27}

b) 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.

c) 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.

d) Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación.^{10, 11, 15}

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.^{15, 26} 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.^{15, 28}

3.2.3.2.- Criopreservación

El término criopreservación se refiere a la preservación de materiales biológicos a temperaturas criogénicas, generalmente a -80 °C (hielo seco) o -196 °C (nitrógeno líquido). La temperatura baja protege las proteínas y la desnaturalización del ADN, también disminuye el movimiento del agua celular. La preservación de las células a -20 °C no se recomienda para la conservación a largo plazo.

Conservación a -80 °C es adecuado, pero a -196 °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 °C) o en su fase de vapor (-135 a -150 °C).²⁷

3.2.3.3.- Liofilización ó Freeze – Drying

El principio básico del proceso es congelar la suspensión conidial y remover el agua por sublimación mediante vacío. El período de viabilidad para algunos hongos conservados bajo este método es de 23 años.¹¹

Técnicamente, la liofilización se puede definir como:

- a) 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.
- b) La sublimación del hielo al vacío.
- c) "Evaporación" de agua de la matriz amorfa.^{14, 15}

Consiste en someter a sublimación la solución congelada donde se encuentran las células a conservar.¹² 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.^{14, 15, 16}

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.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram positivas sobreviven mejor que las Gram negativas cuando se liofilizan y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos, muchos hongos y levaduras.^{7, 10}

Una de las objeciones al proceso de liofilizado es la posible pérdida de ciertas características morfológicas o respuesta fisiológica. Sin embargo, las investigaciones 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; los microorganismos viables están presentes en el vapor retirado de las 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%.^{7, 15}

3.3.- Agentes Crioprotectores

Diversos factores afectan la eficacia de la crioconservación de los microorganismos, por ejemplo, la especie, la fase y tasa de crecimiento, 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, duración del almacenamiento y recuperación del medio.^{15, 30}

Para facilitar la preservación de las células durante largos periodos de tiempo es necesario que el medio a congelar contenga un agente crioprotector. Los agentes crioprotectores retardan la formación intracelular de cristales de hielo y reducen el potencial de daño osmótico durante el congelamiento y el descongelamiento.

Entre los agentes crioprotectores utilizados se destacan alcoholes, carbohidratos, aminoácidos, extracto de levadura, leche descremada, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), albúmina sérica bovina entre otros.³¹

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de agentes crioprotectores:

a) Alcoholes: metanol, etanol, propanol, 1-2propanediol, glicerol, etc.

b) Carbohidratos: glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa, etc.

c) Dimetilsulfóxido.

Los agentes crioprotectores también pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes.³²

Se conocen dos tipos de agentes crioprotectores: en el primer grupo se ubica el glicerol y el DMSO, que actúan atravesando la membrana celular para proteger a la célula intracelular y extracelularmente contra la congelación; en el segundo grupo se destacan: sacarosa, lactosa, glucosa, manitol, sorbitol dextrano, polivinilpirrolidona, leche descremada y el poliglicol que ejercen su acción protectora en el exterior de la célula. La selección del agente crioprotector depende del microorganismo a preservar.³¹

Las soluciones de glicerol a una concentración de 10% han demostrado ser útil para la criopreservación de hongos.¹⁵

3.4.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS LEVADURIFORMES

3.4.1.- *Candida krusei*

Las células de *C. krusei* son generalmente alargadas, y tienen la apariencia de un grano de arroz largo. *C. krusei* es un hongo dimórfico; usualmente se encuentra en dos formas morfológicas, como levadura y como pseudohifa, crece a una temperatura máxima de 43 °C a 45 °C. Aunque muchas de las especies de *Candida* de importancia médica requieren biotina y algunos requerimientos vitamínicos adicionales, solo *C. krusei* puede crecer en medios sin vitaminas, además asimila y fermenta solamente la glucosa.³³

De las especies de *Candida* de importancia médica, *C. krusei* es quizás la única especie que crece en agar Sabouraud dextrosa como colonias blanquecinas o amarillentas de superficie áspera y de aspecto mate.³³

Generalmente *C. krusei* es considerada como un comensal transitorio en el humano, sin embargo, recientemente se ha descrito como un patógeno con un espectro de manifestaciones clínicas tales como fungemia, endoftalmitis, endocarditis y artritis, la mayoría de los cuales se producen en grupos de pacientes comprometidos inmunológicamente.³³

3.4.2.- *Candida glabrata*

Candida glabrata representa el segundo patógeno oportunista fúngico en humanos más frecuente después de *Candida albicans*. Puede causar infecciones en las mucosas superficiales y candidiasis sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar, ya que se ha vuelto resistente a muchos antifúngicos (azoles), especialmente el fluconazol; en consecuencia, las candidiasis producidas por *C. glabrata* tienen una alta tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos.^{34, 35}

C. glabrata es una levadura no dimórfica que existe como blastoconidias en todas las condiciones ambientales, también como patógeno. De hecho, *C. glabrata* es la única especie de *Candida* que no forma pseudohifas a temperaturas cercanas a 37°C. En agar Sabouraud dextrosa, *C. glabrata* forma colonias brillantes, lisas de color crema las cuales son relativamente indistinguibles de otras especies de *Candida*, excepto por su tamaño, las cuales son bastante pequeñas. Una característica distintiva de *C. glabrata* es su genoma haploide en contraste con el genoma diploide de varias especies de *Candida*, del mismo modo *C. glabrata* es distinguible por su pequeña subunidad de RNA ribosomal.^{35, 36} Las reacciones bioquímicas de *C. glabrata* son bastante distintas con respecto a *C. albicans*, la cual fermenta varios carbohidratos, mientras que *C. glabrata* fermenta y asimila sólo la glucosa y la trehalosa.³⁴

3.4.3.- *Candida stellatoidea*

C. stellatoidea taxonómicamente es similar a *C. albicans* y se distingue de ésta última por la capacidad de asimilar la sacarosa y por la morfología colonial.³⁷

Además en un estudio, se comprobó que *C. stellatoidea* no es patógena en conejos, mientras que *C. albicans* produce una infección fatal con una dosis equivalente.³⁸

3.4.4.- *Candida albicans*

Esta levadura es un hongo dimórfico oportunista causante de la mayoría de los casos de candidiasis. *C. albicans* es habitante común de las membranas mucosas de los seres humanos y otros animales. Genera un amplio espectro de enfermedades, puede causar infecciones en la piel y en las uñas, o puede invadir las células epiteliales de la cavidad oral, el esófago, el estómago y la vagina; incluso puede desarrollar situaciones clínicas más graves en las que *C. albicans* invade tejidos más profundos como los riñones, el corazón, el hígado, los pulmones, el bazo, el cerebro y los ojos. Es un hongo dimórfico que se presenta como blastoconidias y como hifas o pseudohifas, éste tipo de morfología celular también se le denomina tubo germinal; incluso, la identificación de *C. albicans* se realiza por la capacidad de éste hongo de generar tubo germinal a las 2-3 h a 37 °C, cuando se encuentra en un medio nutritivo líquido (suero o plasma).³⁹

En agar Sabouraud, el crecimiento de *C. albicans* suele ser rápido, generándose colonias circulares, lisas, blancas, cremosas y convexas. Los blastoconidios de esta especie de *Candida* son considerablemente más grandes que las blastoconidias de *C. glabrata*; además *C. albicans* tiene la particularidad de generar estructuras denominadas clamidiosporas, en agar harina de maíz. Las clamidiosporas son formas de resistencia redondas u ovals de pared gruesa con aspecto de esporas laterales o terminales.^{34, 39}

3.4.5.- *Candida tropicalis*

En agar Sabouraud dextrosa *C. tropicalis* forma colonias de color crema con un borde ligeramente micelial; en agar harina de maíz Tween 80 a 25 °C y después de 72 h, *C. tropicalis* produce blastosporas ovals, o pseudohifas. Esta levadura tiene la habilidad de fermentar y asimilar la sacarosa y la maltosa.^{35, 40}

Es un hongo, dimórfico oportunista del ser humano, generando candidiasis en pacientes inmunocomprometidos. Actualmente, es común el uso de ésta levadura para la producción eficiente de ácido dicarboxílicos de cadena larga, importante para la industria farmacéutica.⁴⁰

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las tareas más importantes de los laboratorios de microbiología es la manutención y conservación de microorganismos, a fin de mantener su pureza, viabilidad y estabilidad morfológica y genética, ya que son esencialmente empleados como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica de diversos productos alimenticios, procesos, equipos, medios de cultivo, reactivos; obtención de antibióticos, enzimas, elaboración de alimentos, fabricación de disolventes y reactivos, entre otros. Representando un papel importante para el desarrollo de la investigación, la biotecnología, la medicina y la agricultura.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza se utilizan hongos levaduriformes para el desarrollo de microtécnicas; actualmente en el Laboratorio no se cuenta con algún método de conservación a mediano plazo para levaduras. Para mantenerlas se hacen resiembras continuas lo cual involucra tiempo, trabajo y material por lo que el propósito de este proyecto es desarrollar un método de conservación eficiente de cepas levaduriformes acorde a las necesidades del laboratorio y disminuir los costos que implican los pases para conservarlos.

5.- HIPÓTESIS

- El método de conservación en capilar es capaz de garantizar la viabilidad y conservación de las propiedades bioquímicas (Zimograma) de los hongos levaduriformes: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* después de un periodo de 90 días a una temperatura de -20 °C.

6.- OBJETIVO GENERAL

- Implementar un método de conservación de hongos levaduriformes para el Laboratorio de Microbiología e Inmunología número 1 Planta Alta de la UMIEZ.

6.1.- OBJETIVO ESPECÍFICO

- Aplicar un método de conservación en capilar para hongos levaduriformes.
- Conservar por congelación (-20 °C) los siguientes hongos levaduriformes: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.
- Evaluar la viabilidad de: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* en el tiempo; 0, 15, 30, 60 y 90 días.
- Evaluar las características bioquímicas de las levaduras por medio del Zimograma conservadas por este método en el tiempo; 0, 15, 30, 60, y 90 días.

7.- MATERIAL

- Mechero Fisher.
- Tubos de ensayo de 13x100 con tapón de rosca. Pyrex.
- Gradilla.
- Cajas Petri estériles. Pyrex.
- Pipeta graduada de 10 mL. FALCON.
- Jeringa 5 mL.
- Pipetor. Powerpette JENCONS.
- Capilares D.O. 1.40-1.60mm vol. 80µL s/ heparina. LAUKA.
- Algodón. PROTEC.
- Lápiz punta diamante.
- Puntas para micropipetas estériles 10- 100 µL; 100-1000µL. BioClean.
- Probeta de 100 mL. Pyrex.
- Matraz Erlenmeyer 250 mL. Pyrex.
- Campanas de Durham. Pyrex.

7.1.- EQUIPO

- Olla de Presión. PRESTO.
- Incubadora 37 °C ± 2 °C. SHEL LAB.
- Microscopio Electrónico. PRIMO STAR ZEISS.
- Baño Metabólico 45 °C. GCA/PRECISION CIRCULATING SYSTEM-253.
- Balanza Digital. Explorer PRO.
- Congelador -20 °C. Tor Rey.
- Refrigerador 4 °C. MABE TWIST AIR.
- Espectrofotómetro. THERMO SCIENTIFIC SPECTRONIC 20+.

7.2.- MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Sabouraud BD BBL.
- Caldo Sabouraud BD BBL.

7.3.- REACTIVOS

- Solución salina inyectable 0.9%.PISA.
- Leche descremada en polvo. Svelty.
- Solución Alcohol-Yodo.
- Agua destilada.
- Dextrosa. Merck.
- Trehalosa. Merck.
- Galactosa. Sigma.
- Maltosa. Merck.
- Sacarosa. Merck.
- Rafinosa. Dilco.
- Lactosa. Técnica Química.
- Púrpura de Bromo Cresol (PBC).

7.4.- CEPAS

- *Candida krusei*.
- *Candida glabrata*.
- *Candida stellatoidea*.
- *Candida albicans*.
- *Candida tropicalis*.

8.- DIAGRAMA DE FLUJO



I. Caracterización de los hongos levaduriformes.

Realizar Zimograma para confirmar las 5 diferentes especies del género Candida.

- a) Disolver 10 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl, 1 mL de NaOH (1 N), 100 mL de indicador Púrpura de Bromo Cresol (PBC) y aforar a 1000 mL con agua destilada.
- b) Calentar durante un minuto a ebullición y dispensar 4.5 mL a tubos con tapa de rosca y colocarle una campana de Durham a cada tubo.
- c) Adicionar a cada tubo con tapa de rosca 0.5 mL de carbohidrato al 10%.
- d) Esterilizar en olla de presión los tubos a 10 libras durante 15 minutos.
- e) Realizar control de esterilidad incubando a 37 °C por 24 horas.
- f) Inocular los tubos de Zimograma con cada hongo levaduriforme e incubar a 37 °C.
- g) Observar y reportar la fermentación de cada carbohidrato.
- h) Resembrar por agotamiento cada hongo en dos tubos de Agar Sabouraud BD BBL; uno de trabajo y el otro de reserva e incubar a 37 °C de 24 a 72 horas.

II. Implementación del Método de Conservación.

Ajuste de la carga de levaduras mediante la escala de Mc Farland.

Para cada levadura:

- a) Con una jeringa estéril medir 3 mL de Solución inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) y dispensarlo al tubo inclinado de Agar Sabouraud BD BBL inoculado con cada una de las cepas de estudio y agitar hasta obtener una suspensión turbia.

b) Pasar esta suspensión a una celda estéril para espectrofotómetro y comparar visualmente con el tubo 8 de Mc Farland (2.4×10^9 UFC), en caso de estar más turbia la suspensión resultante, agregar solución inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) suficiente para obtener una turbidez igual al tubo 8 del nefelómetro. Posteriormente realizar un segundo ajuste en el espectrofotómetro entre 3 y 7 de transmitancia; y una vez ajustada la solución pasarla a un tubo de ensaye 13 x 100 con tapón de rosca estéril, almacenar a 4 °C hasta su uso.

III. Peso de la Carga Micótica en el Tubo Capilar

a) En balanza analítica, pesar 10 tubos capilares vacíos uno por uno, obtener la media del peso de los tubos capilares pesados.

b) Marcar con tinta indeleble cada tubo capilar en tres partes iguales, llenar el tubo capilar a una tercera parte con agua común y sellar a la flama por ambos extremos, volver a pesar cada uno de los tubos nuevamente en la balanza y obtener una media del peso de los tubos capilares llenos a su tercera parte.

c) Este paso servirá para saber aproximadamente el valor en μL de la carga de levaduras por tubo capilar.

IV. Ajuste de la Concentración y Esterilización de la Leche Descremada Svelty Mediante Calor Húmedo a Presión.

- a) Preparar 50 mL leche descremada al 20%, agregar 10 g de leche descremada Svelty en polvo en un matraz Erlenmeyer y disolver en 40 mL de Agua destilada.
- b) Tapar el matraz Erlenmeyer con una torunda de algodón y esterilizar por calor húmedo a 10 lb de presión por 15 minutos en autoclave.

V. Prueba como Crioprotector de la Leche Descremada.

- a) Tomar 1 mL de la solución ajustada de la levadura con una Micropipeta (BioHit Proline) y colocar en un tubo de ensaye estéril con tapón de rosca.
- b) Adicionar 1 mL de la leche descremada estéril al mililitro del microorganismo.
- c) Llenar a una tercera parte 200 capilares estériles cerca del mechero en una zona limpia con la suspensión del paso anterior, sellar a la flama el tubo capilar por ambos extremos.
- d) Colocar los tubos capilares en un tubo de ensaye con tapón de rosca, tapar y rotular; almacenar en congelación.

Nota: Repetir este procedimiento para cada una de las levaduras en estudio.

VI. Prueba de Conservación a -20 °C.

- a) Conservar los tubos capilares de cada levadura a una temperatura de congelación (-20 °C).

VII. Prueba de Viabilidad al Tiempo 0, 15, 30 ,60 y 90 Días.

Nota: La prueba de viabilidad al tiempo 0 se va a realizar el mismo día que se llenan y sellan los tubos capilares.

- a) Limpiar los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada de solución alcohol-yodo.
- b) Marcar los extremos del tubo capilar con un lápiz punta diamante y romper por los extremos del tubo con unas pinzas, inocular su contenido en 5 mL de Caldo Sabouraud BD BBL de un solo golpe, tapar, agitar e incubar a 37 °C por 24 h.
- c) Posterior a las 24 h de incubación tomar un inculo de 45 µL del caldo Sabouraud del paso anterior y con una pipeta Powerpette JENCONS inocular una caja Petri estéril Pyrex.
- d) Agregar enseguida 15 mL de Agar Sabouraud BD BBL estéril a 45 °C en la misma caja Petri y homogenizar. Dejar solidificar e incubar a 37 °C por 24 h.
- e) A cada uno de los cultivos, realizar lectura de morfología colonial y microscópica a las 24 y 48 h de incubación.

Nota: Realizar este procedimiento para cada periodo de conservación

(0, 15, 30, 60,90 días) y para cada una de las bacterias en estudio

9.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de Estudio: Experimental y Prospectivo.

Población de Estudio: Cepas de hongos levaduriformes.

Criterios de inclusión: Cepas de hongos levaduriformes identificadas.

Criterios de exclusión: Cepas contaminadas y de alto riesgo y patogenicidad.

9.3.- VARIABLES

Dependiente: Cepas de hongos levaduriformes.

Independiente: Temperatura.

Crioprotector.

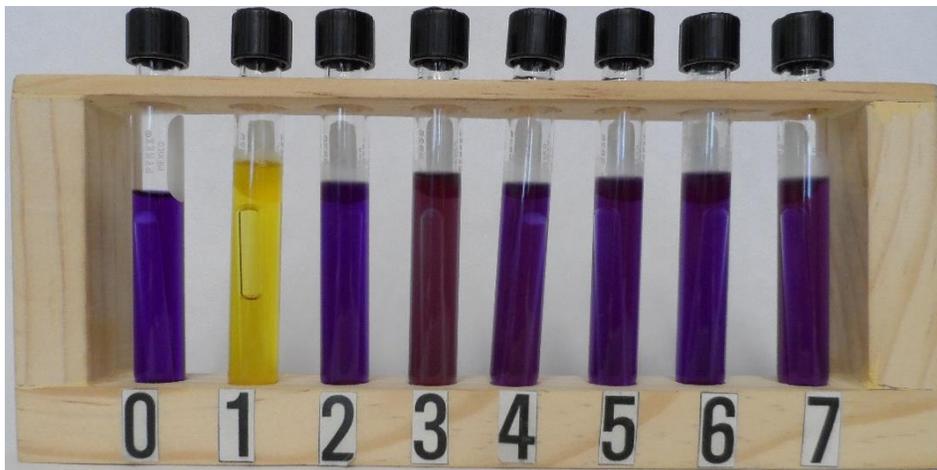
Tiempo de Conservación

10.- RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la parte práctica del proyecto, al principio se muestran los resultados de caracterización de las respectivas levaduras por medio del Zimograma, posteriormente se muestra el método de conservación implementado en el laboratorio, y por último aparecen los resultados de viabilidad y Zimogramas realizados a cada una de las especies de las levaduras durante los 90 días de conservación a -20 °C.

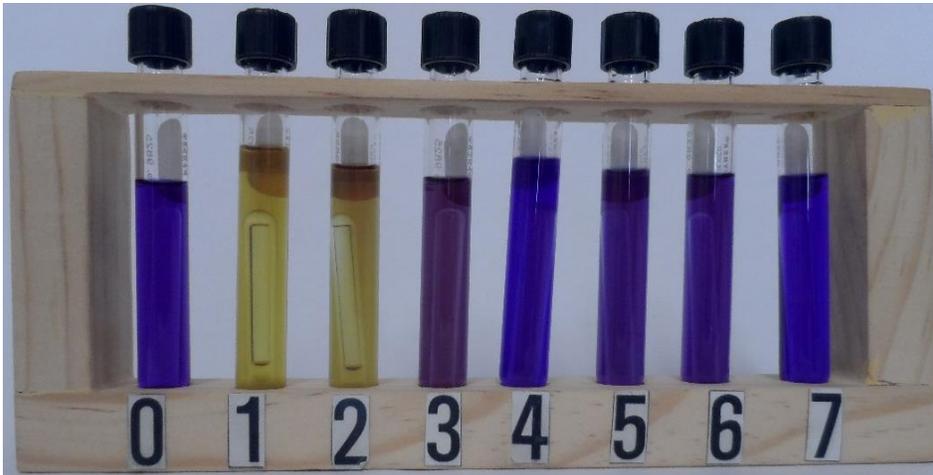
La fermentación de carbohidratos (Zimograma) evalúa la capacidad de fermentación y producción de ácidos a partir de diversos carbohidratos, dispuestos en un medio base de composición variable que incluye un indicador de pH. El estudio de fermentación ayuda a diferenciar las especies del género *Candida*.

10.1.- Caracterización de las Distintas Especies del Género *Candida* por medio de Zimograma.



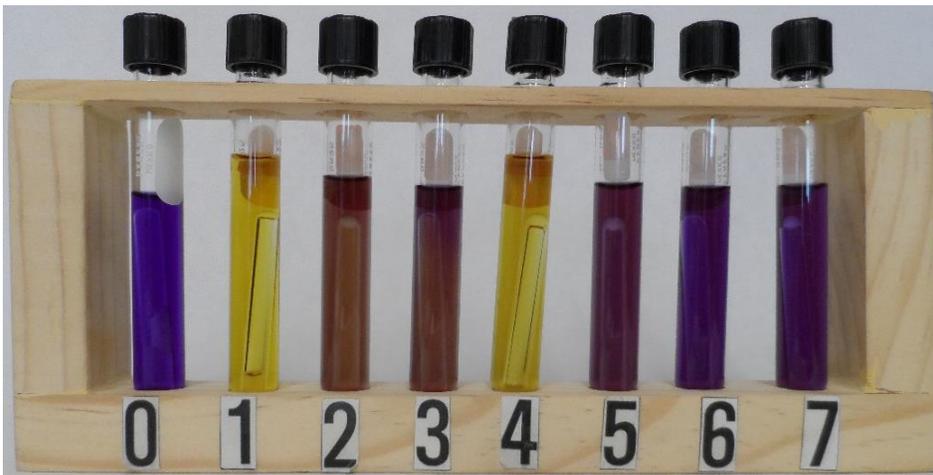
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 1. Resultado de la caracterización por medio de Zimograma de la levadura *C. krusei* fermentando únicamente glucosa en el día 5.



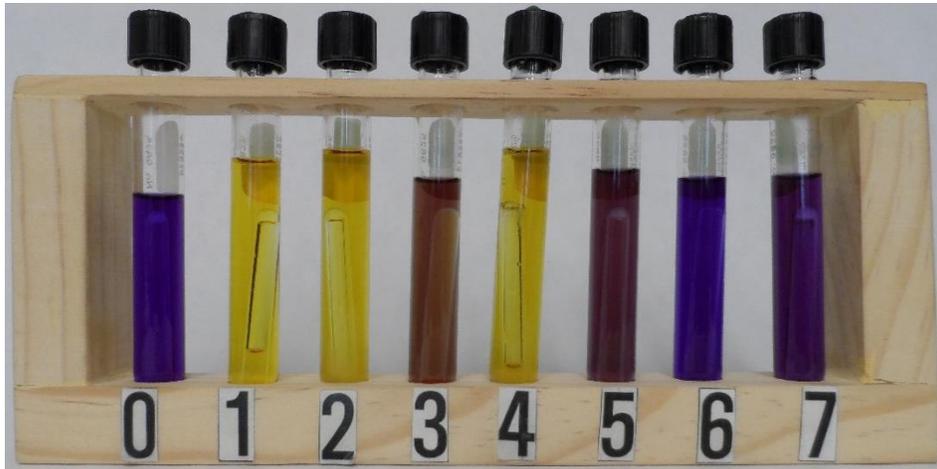
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 2. Resultado de la caracterización por medio de Zimograma de la levadura *C. glabrata* fermentando únicamente: glucosa y trehalosa en el día 5.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 3. Resultado de la caracterización por medio de Zimograma de la levadura *C. stellatoidea* fermentando únicamente: glucosa y maltosa en el día 5.

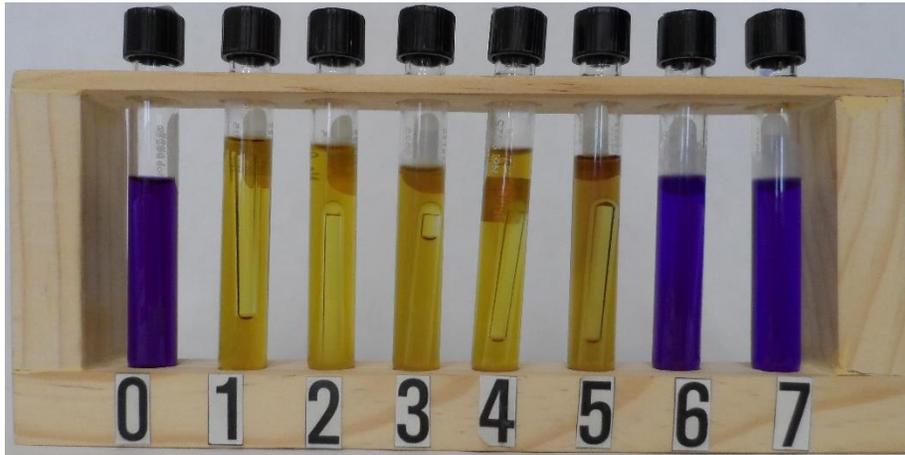


- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 4. Resultado de caracterización por medio de Zimograma de la levadura *C. albicans* fermentando: glucosa, trehalosa y maltosa en el día 5.



Fotografía 5. Producción de tubo germinativo de *C. albicans* en suero humano. 10x en microscòpio.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 6. Resultado de caracterización por medio de Zimograma de la levadura *C. tropicalis* fermentando: glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 5.

10.2.- Método de Conservación Implementado en el Laboratorio.



Fotografía 7. Tubos capilares sellados a la flama conteniendo la levadura con el crioprotector.

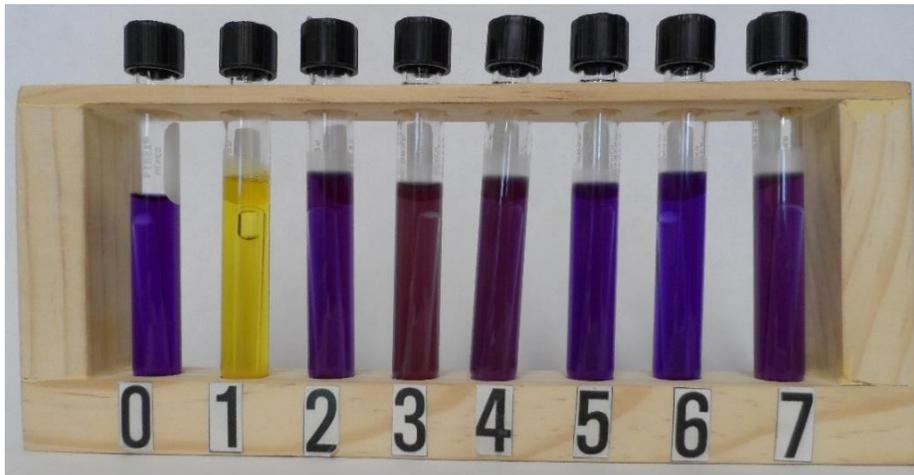


Fotografía 8. Almacenamiento de los tubos capilares en un tubo con tapón de rosca rotulado y cerrado.

10.3.- Pruebas de Viabilidad y Resultados de Zimogramas Realizados a las Distintas Levaduras Durante los 90 Días de Conservación.

10.4.- Candida krusei.

10.4.1.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 0.



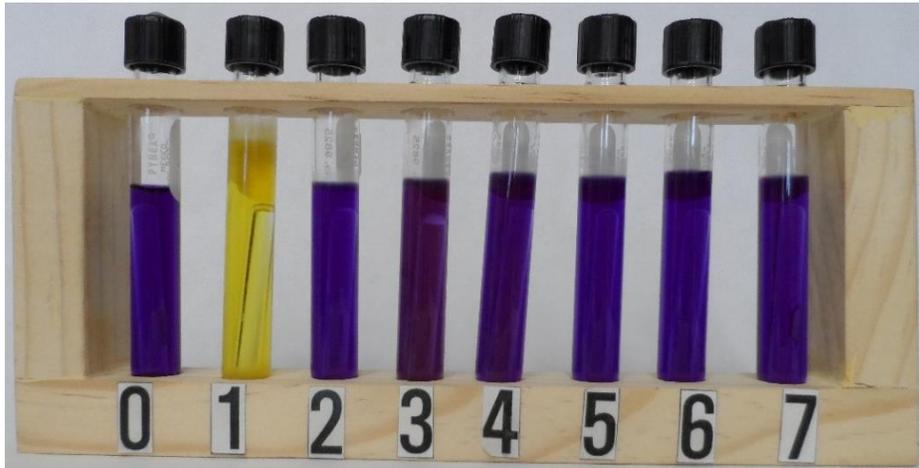
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 9. Zimograma realizado a *C. krusei* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, en el día 0 del método de conservación.



Fotografía 10. Prueba positiva de viabilidad de *C. krusei* en agar Sabouraud en el día 0 del método de conservación.

10.4.2.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 15.



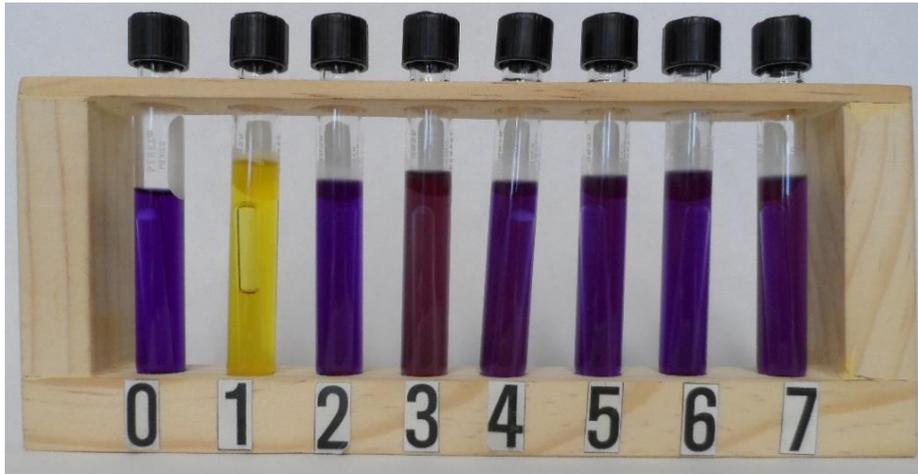
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 11. Zimograma realizado a *C. krusei* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, en el día 15 del método de conservación.



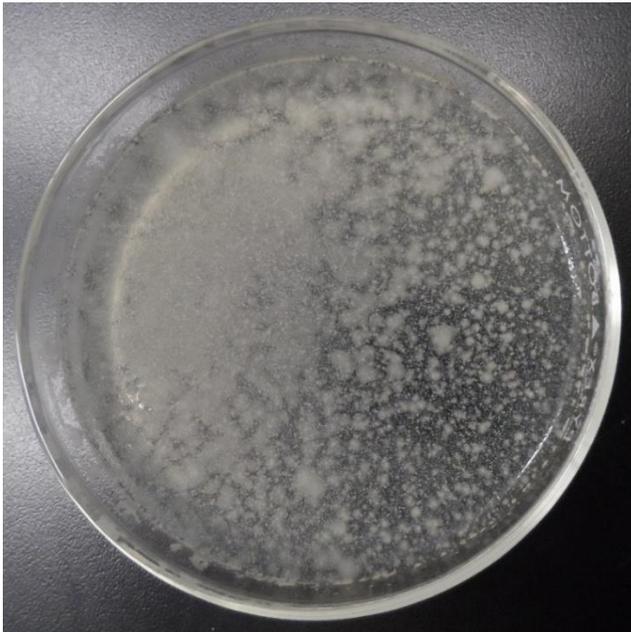
Fotografía 12. Prueba positiva de viabilidad de *C. krusei* en agar Sabouraud en el día 15 del método de conservación.

10.4.3.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 30.



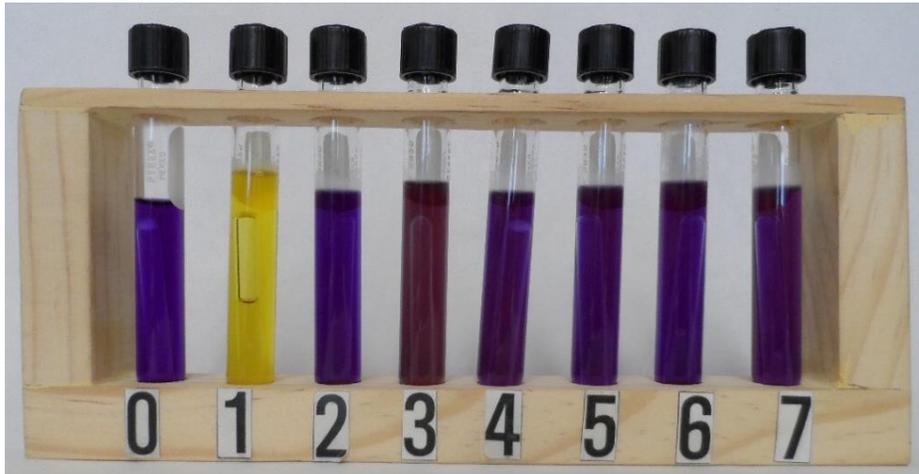
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 13. Zimograma realizado a *C. krusei* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, en el día 30 del método de conservación.



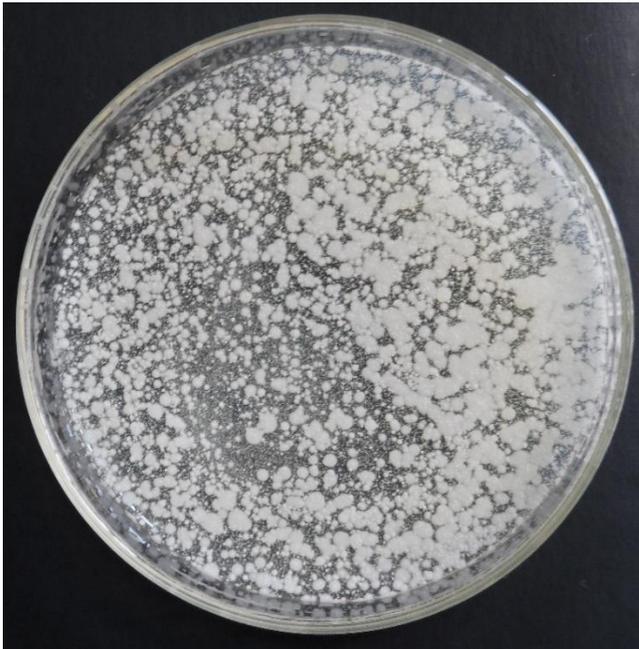
Fotografía 14. Prueba positiva de viabilidad de *C. krusei* en agar Sabouraud en el día 30 del método de conservación.

10.4.4.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 60.



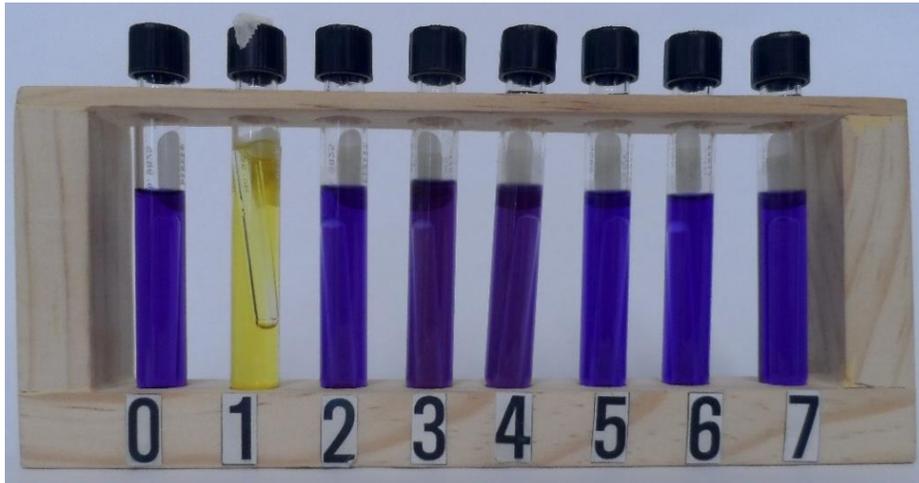
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 15. Zimograma realizado a *C. krusei* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, en el día 60 del método de conservación.



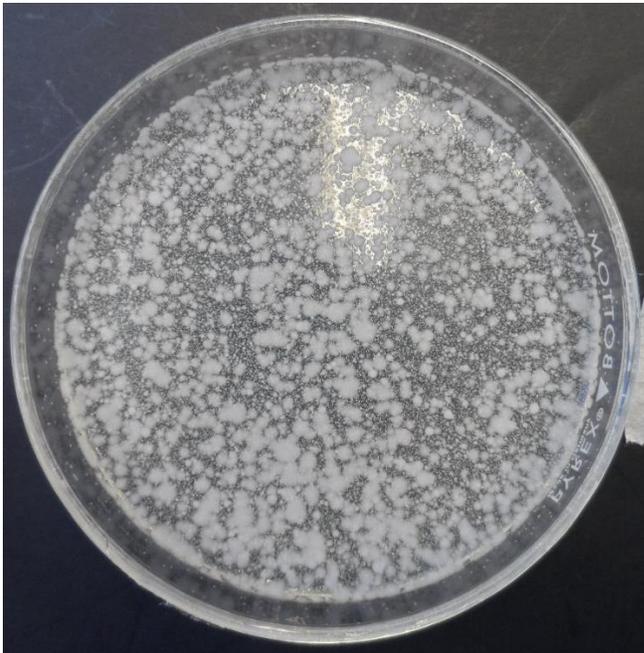
Fotografía 16. Prueba positiva de viabilidad de *C. krusei* en agar Sabouraud en el día 60 del método de conservación.

10.4.5.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 90.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

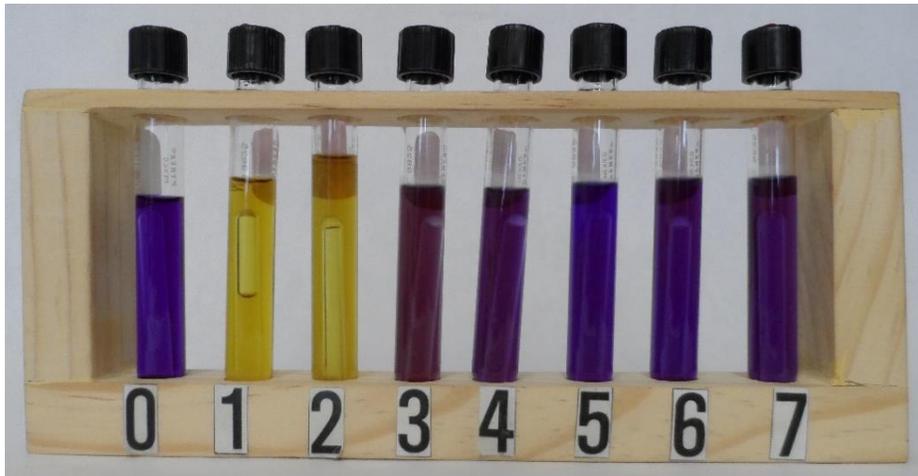
Fotografía 17. Zimograma realizado a *C. krusei* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, en el día 90 del método de conservación.



Fotografía 18. Prueba positiva de viabilidad de *C. krusei* en agar Sabouraud en el día 90 del método de conservación.

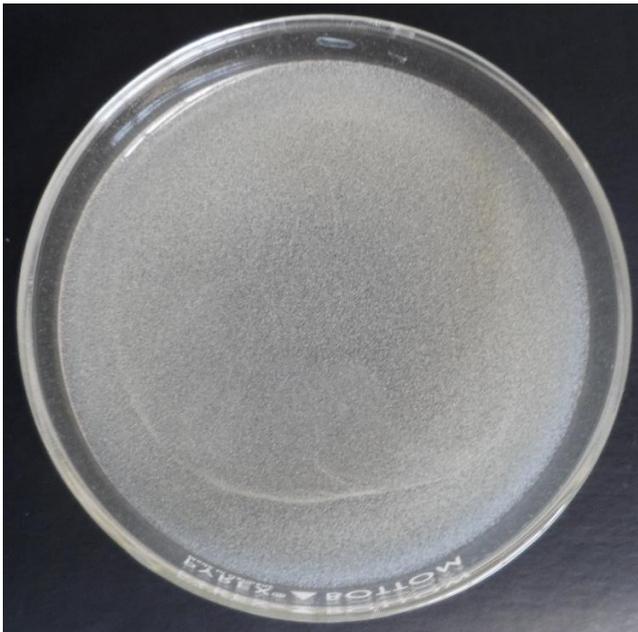
10.5.- Candida glabrata.

10.5.1.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 0.



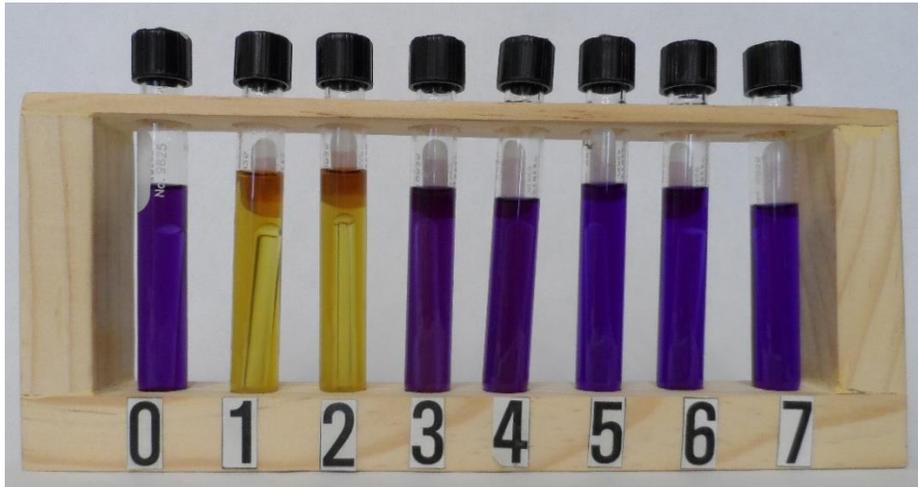
0= control
negativo
1= Glucosa
2= Trehalosa
3= Galactosa
4= Maltosa
5= Sacarosa
6= Rafinosa
7= Lactosa

Fotografía 19 Zimograma realizado a *C. glabrata* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y trehalosa, en el día 0 del método de conservación.



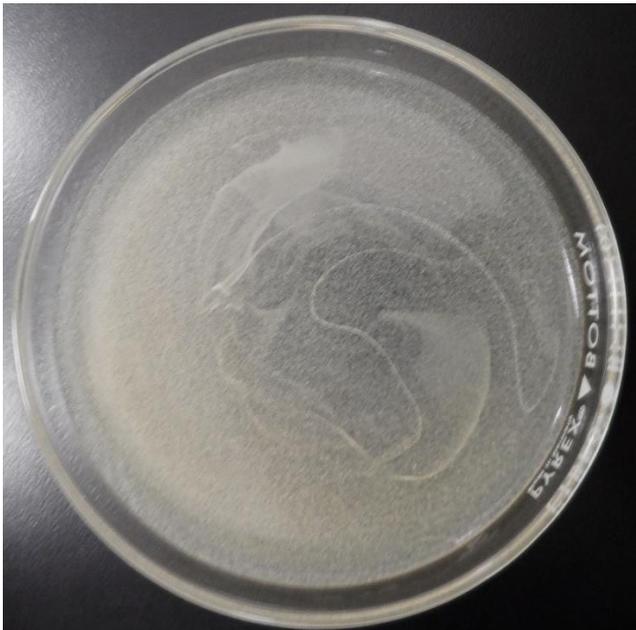
Fotografía 20. Prueba positiva de viabilidad de *C. glabrata* en agar Sabouraud en el día 0 del método de conservación.

10.5.2.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 15.



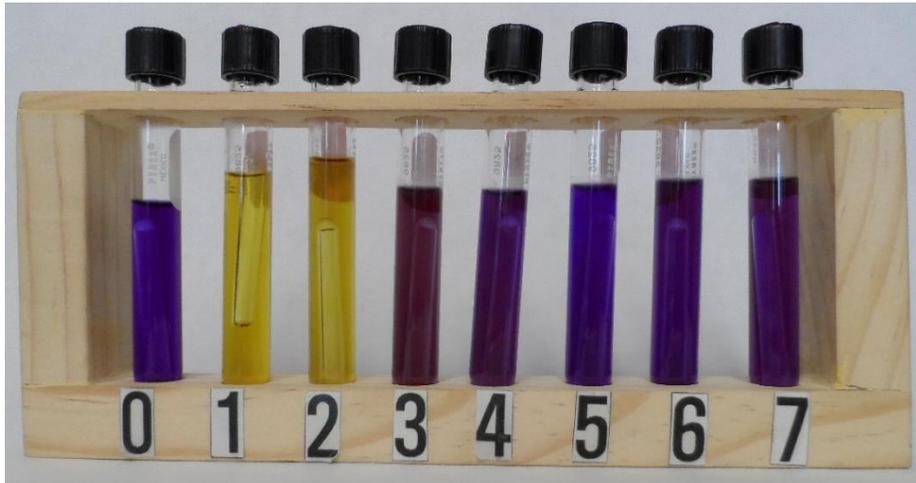
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 21. Zimograma realizado a *C. glabrata* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y trehalosa, en el día 15 del método de conservación.



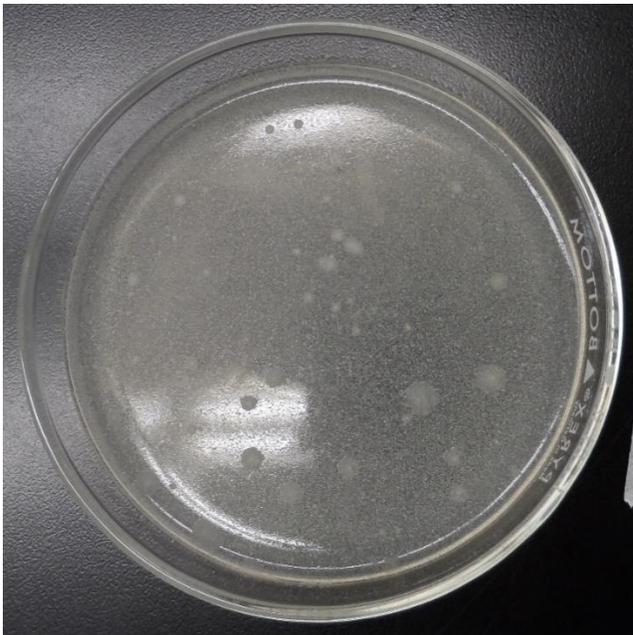
Fotografía 22. Prueba positiva de viabilidad de *C. glabrata* en agar Sabouraud en el día 15 del método de conservación.

10.5.3.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 30.



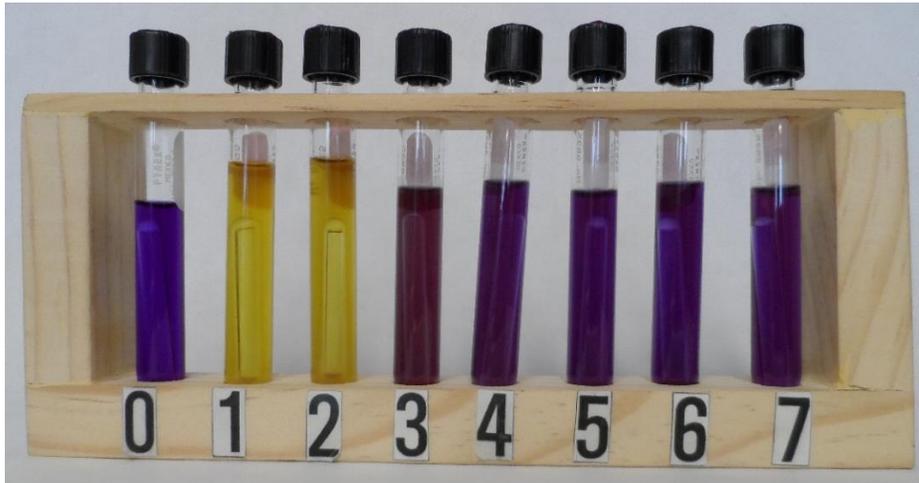
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 23. Zimograma realizado a *C. glabrata* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y trehalosa, en el día 30 del método de conservación.



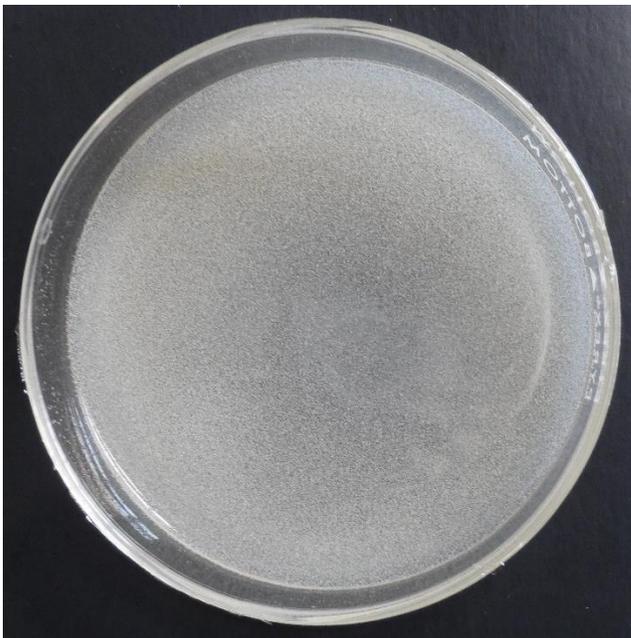
Fotografía 24. Prueba positiva de viabilidad de *C. glabrata* en agar Sabouraud en el día 30 del método de conservación.

10.5.4.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 60.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 25. Zimograma realizado a *C. glabrata* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y trehalosa, en el día 60 del método de conservación.



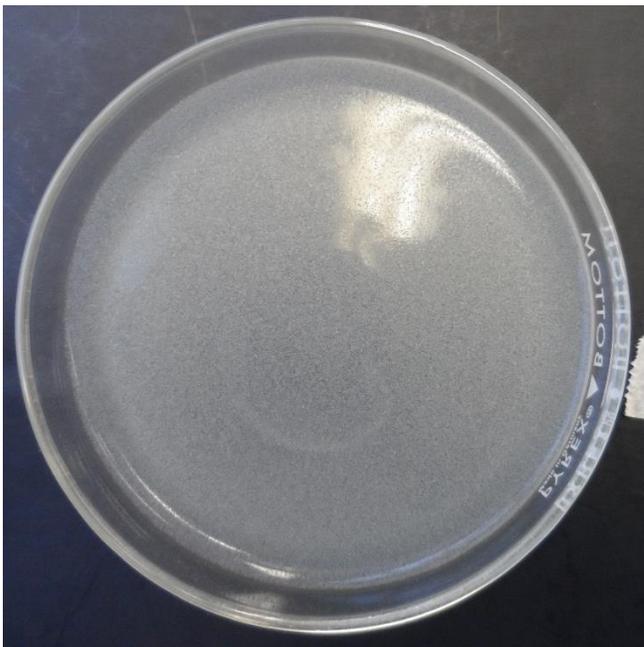
Fotografía 26. Prueba positiva de viabilidad de *C. glabrata* en agar Sabouraud en el día 60 del método de conservación.

10.5.5.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 90.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

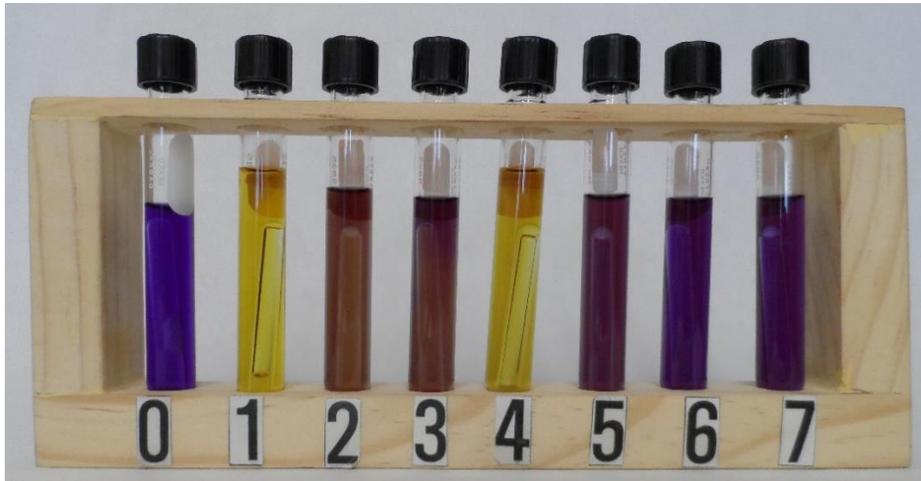
Fotografía 27. Zimograma realizado a *C. glabrata* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y trehalosa, en el día 90 del método de conservación.



Fotografía 28. Prueba positiva de viabilidad de *C. glabrata* en agar Sabouraud en el día 90 del método de conservación.

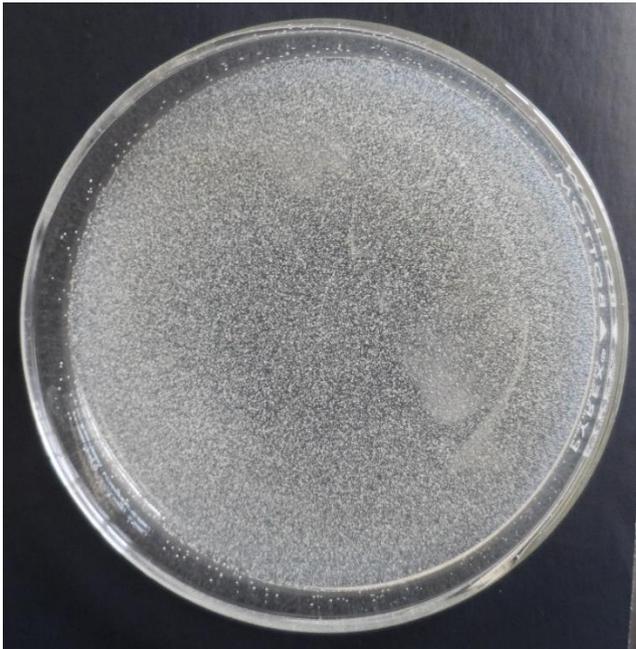
10.6.- Candida stellatoidea.

10.6.1.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 0.



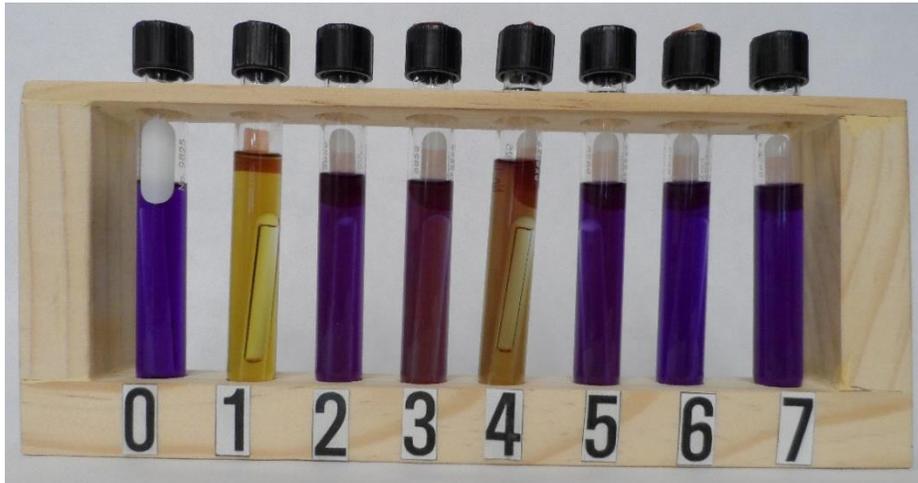
0= control
negativo
1= Glucosa
2= Trehalosa
3= Galactosa
4= Maltosa
5= Sacarosa
6= Rafinosa
7= Lactosa

Fotografía 29. Zimograma realizado a *C. stellatoidea* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y maltosa, en el día 0 del método de conservación.



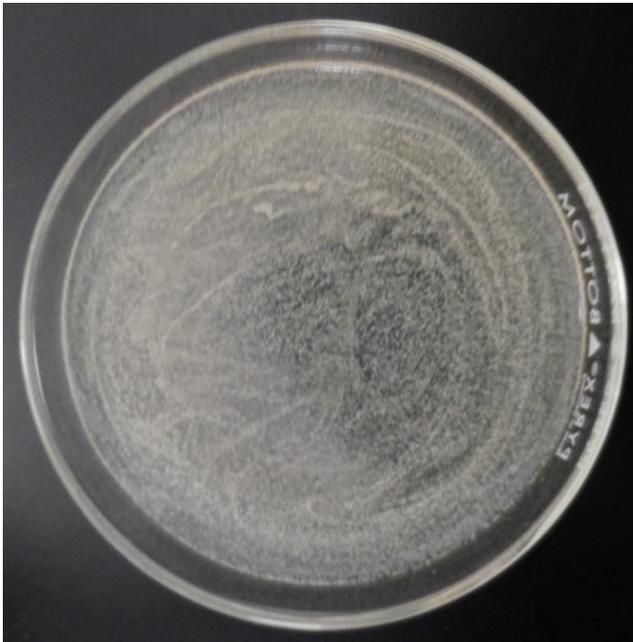
Fotografía 30. Prueba positiva de viabilidad de *C. stellatoidea* en agar Sabouraud en el día 0 del método de conservación.

10.6.2.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 15.



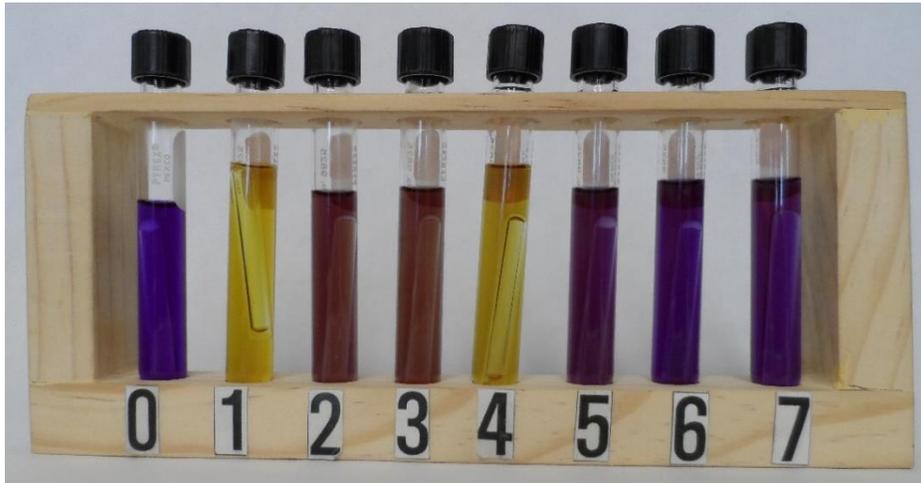
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 31. Zimograma realizado a *C. stellatoidea* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y maltosa, en el día 15 del método de conservación.



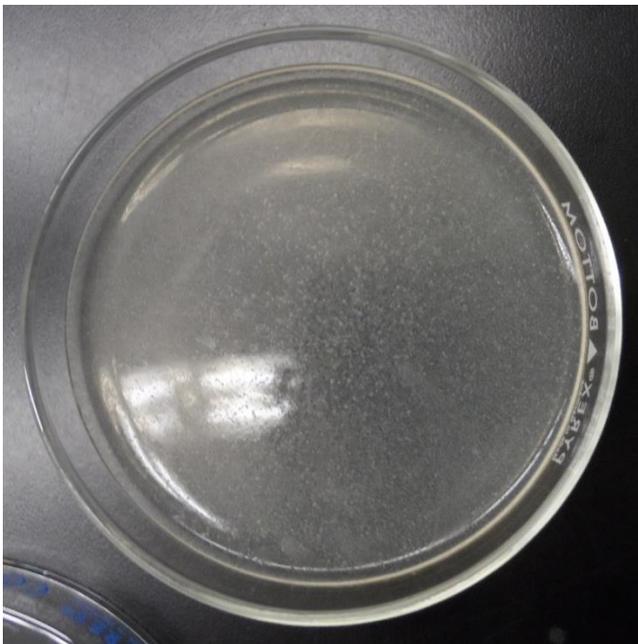
Fotografía 32. Prueba positiva de viabilidad de *C. stellatoidea* en agar Sabouraud en el día 15 del método de conservación.

10.6.3.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 30.



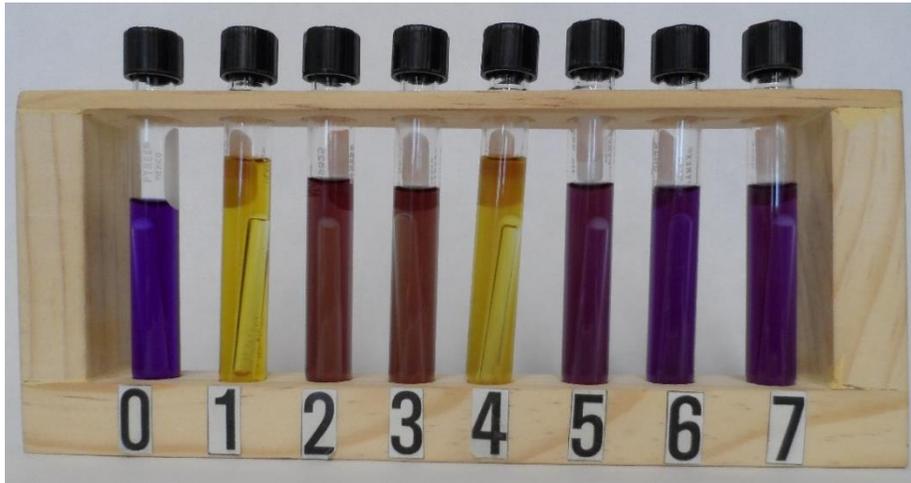
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 33. Zimograma realizado a *C. stellatoidea* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y maltosa, en el día 30 del método de conservación.



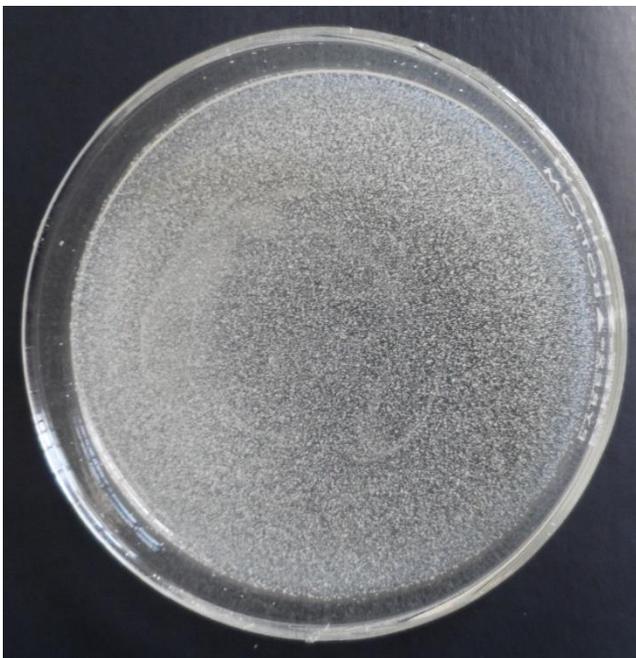
Fotografía 34. Prueba positiva de viabilidad de *C. stellatoidea* en agar Sabouraud en el día 30 del método de conservación.

10.6.4.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 60.



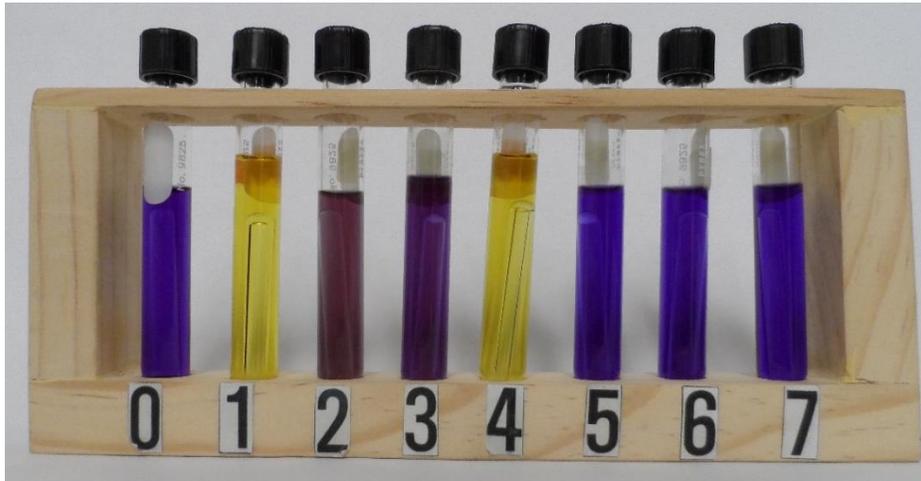
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 35. Zimograma realizado a *C. stellatoidea* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y maltosa, en el día 60 del método de conservación.



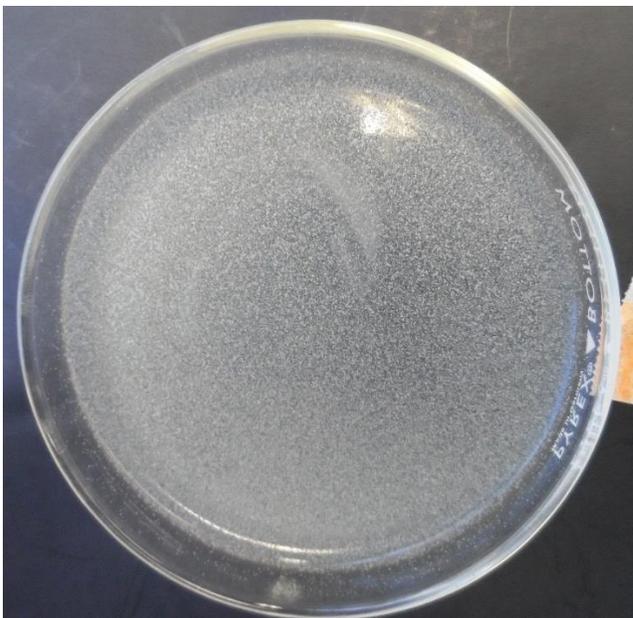
Fotografía 36. Prueba positiva de viabilidad de *C. stellatoidea* en agar Sabouraud en el día 60 del método de conservación.

10.6.5.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 90.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

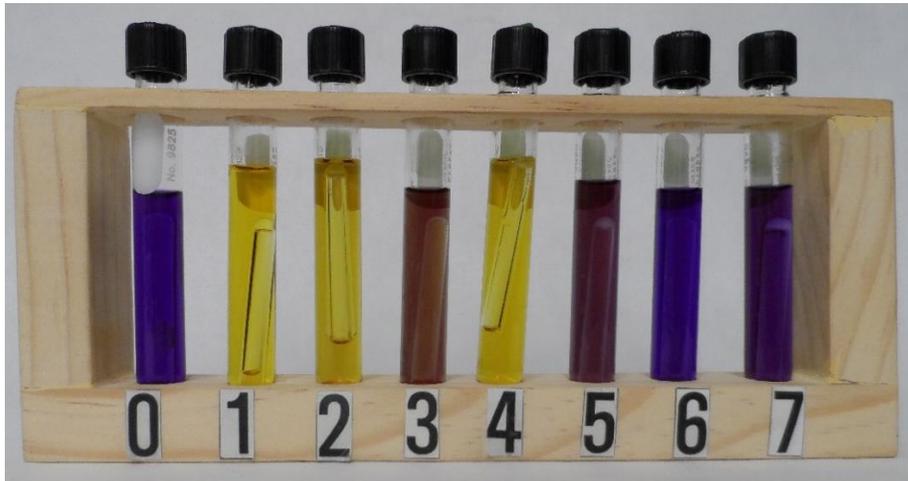
Fotografía 37. Zimograma realizado a *C. stellatoidea* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa y maltosa, en el día 90 del método conservación.



Fotografía 38. Prueba positiva de viabilidad de *C. stellatoidea* en agar Sabouraud en el día 90 del método de conservación.

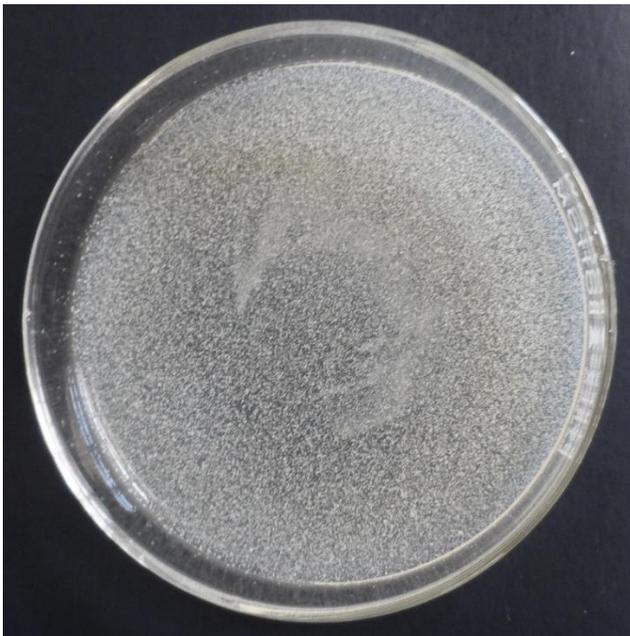
10.7.- Candida albicans.

10.7.1.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 0.



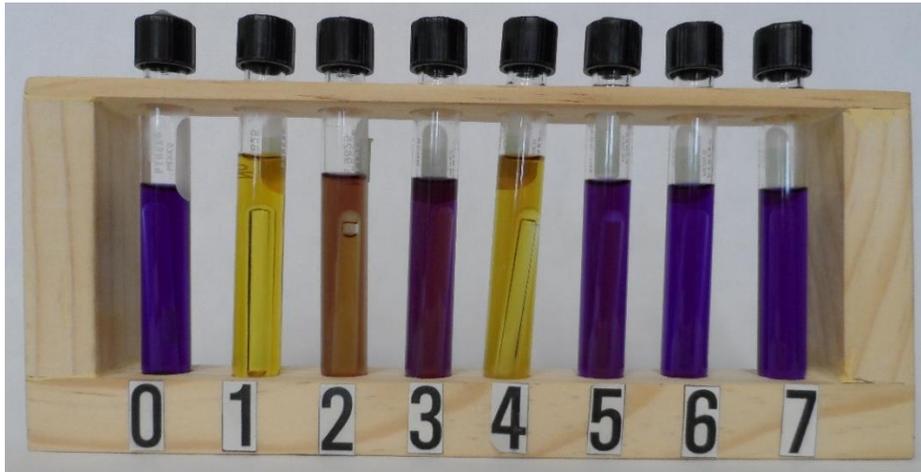
0= control
negativo
1= Glucosa
2= Trehalosa
3= Galactosa
4= Maltosa
5= Sacarosa
6= Rafinosa
7= Lactosa

Fotografía 39. Zimograma realizado a *C. albicans* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa y maltosa, en el día 0 del método de conservación.



Fotografía 40. Prueba positiva de viabilidad de *C. albicans* en agar Sabouraud en el día 0 del método de conservación.

10.7.2.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 15.



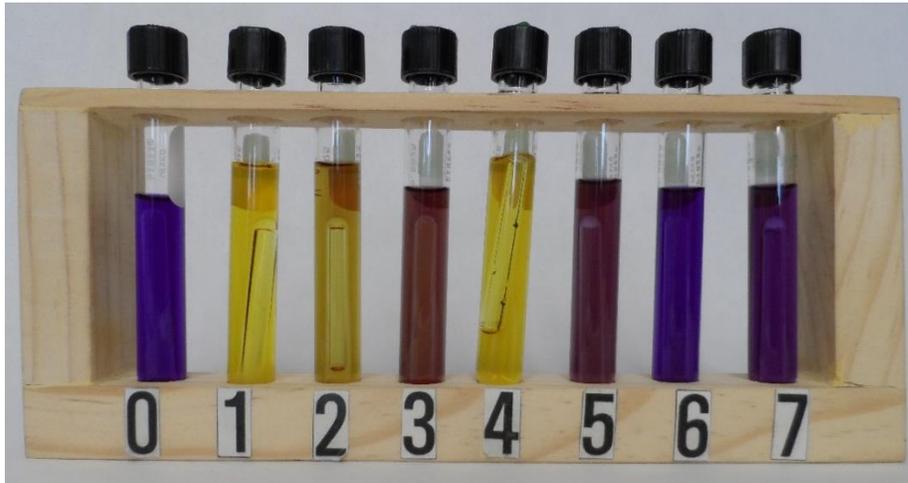
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 41. Zimograma realizado a *C. albicans* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa y maltosa, en el día 15 del método de conservación.



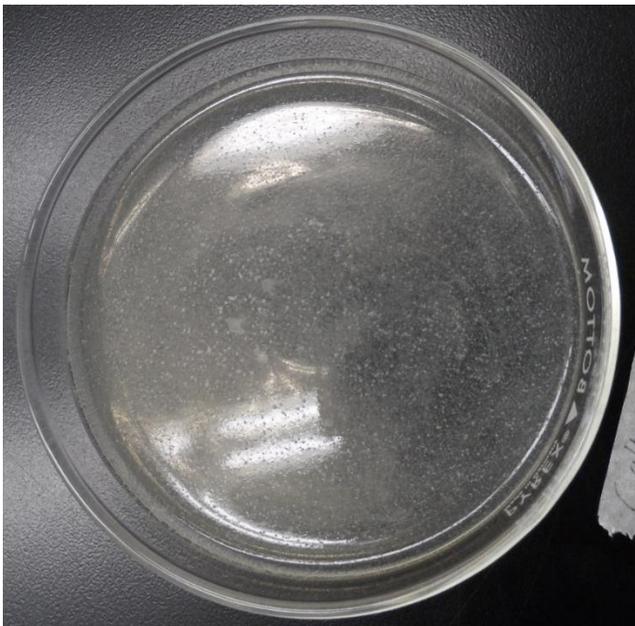
Fotografía 42. Prueba positiva de viabilidad de *C. albicans* en agar Sabouraud en el día 15 del método de conservación.

10.7.3.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 30.



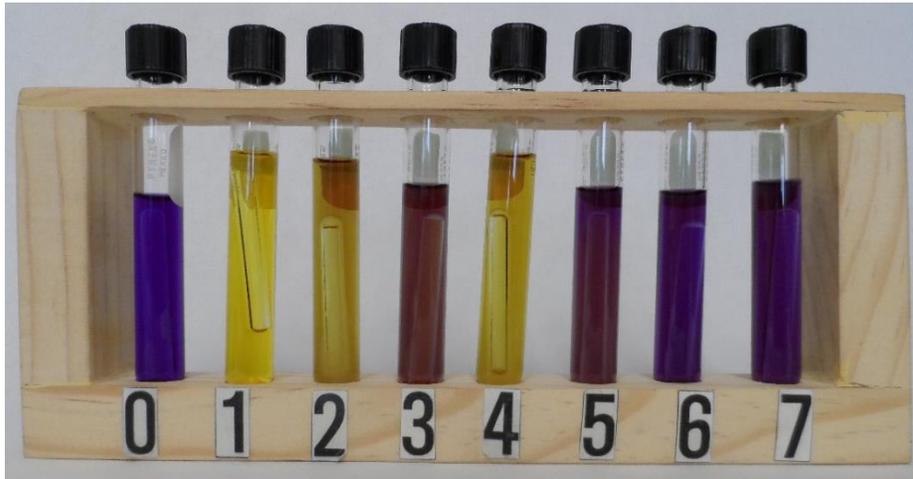
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 43. Zimograma realizado a *C. albicans* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa y maltosa, en el día 30 del método de conservación.



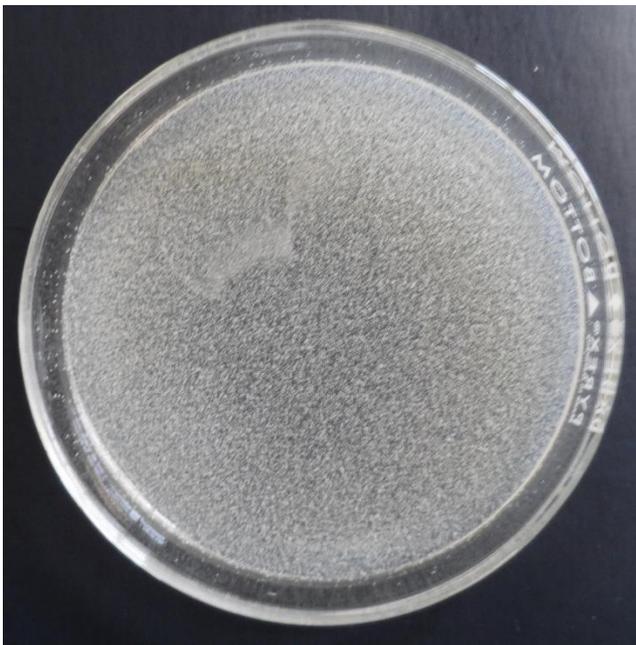
Fotografía 44. Prueba positiva de viabilidad de *C. albicans* en agar Sabouraud en el día 30 del método de conservación.

10.7.4.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 60.



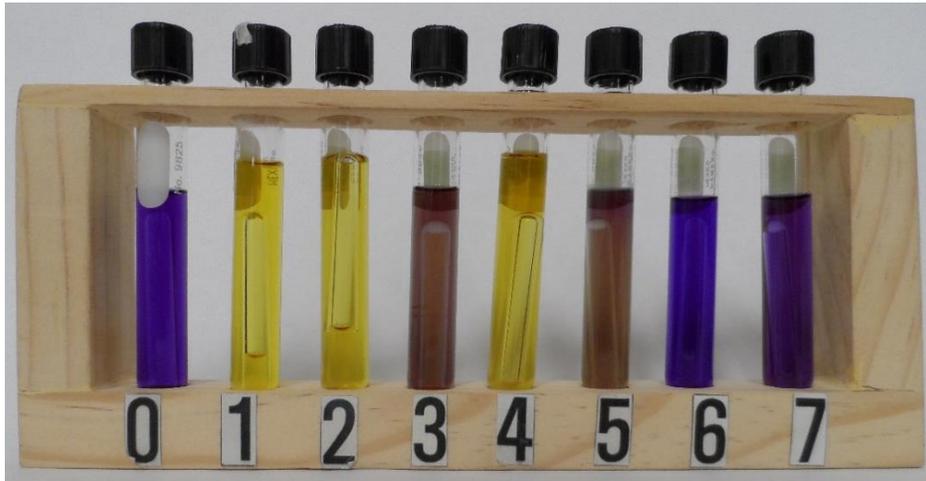
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 45. Zimograma realizado a *C. albicans* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa y maltosa, en el día 60 del método de conservación.



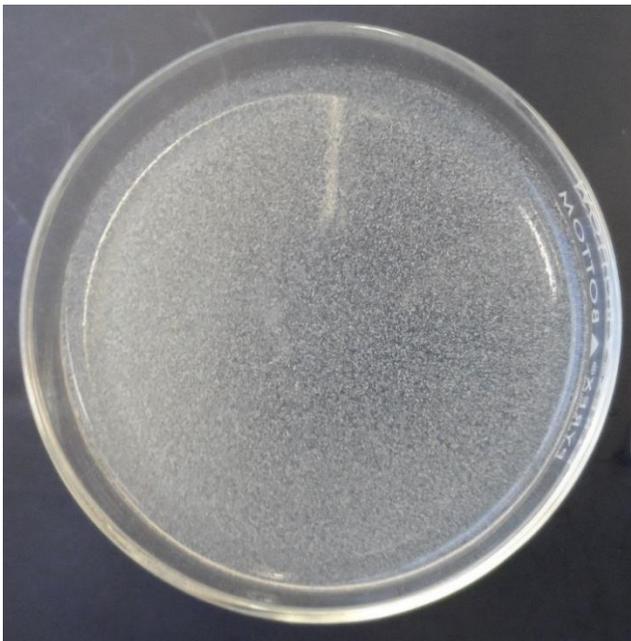
Fotografía 46. Prueba positiva de viabilidad de *C. albicans* en agar Sabouraud en el día 60 del método de conservación.

10.7.5.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 90.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

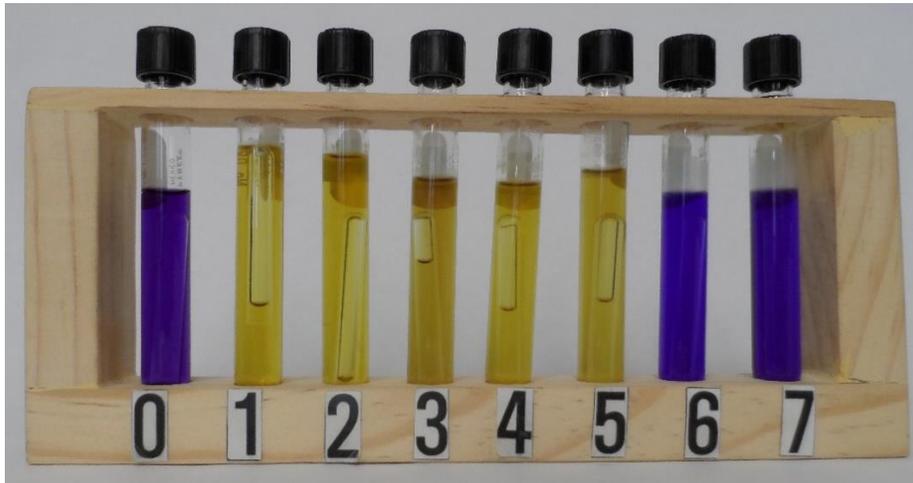
Fotografía 47. Zimograma realizado a *C. albicans* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa y maltosa, en el día 90 del método de conservación.



Fotografía 48. Prueba positiva de viabilidad de *C. albicans* en agar Sabouraud en el día 90 del método de conservación.

10.8.- Candida tropicalis.

10.8.1.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 0.



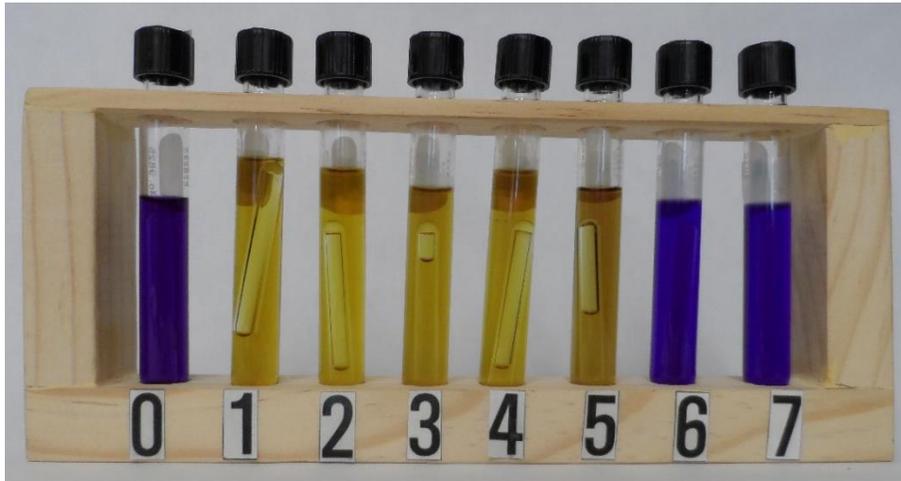
0= control negativo
1= Glucosa
2= Trehalosa
3= Galactosa
4= Maltosa
5= Sacarosa
6= Rafinosa
7= Lactosa

Fotografía 49. Zimograma realizado a *C. tropicalis* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 0 del método de conservación.



Fotografía 50. Prueba positiva de viabilidad de *C. tropicalis* en agar Sabouraud en el día 0 del método de conservación.

10.8.2.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 15.



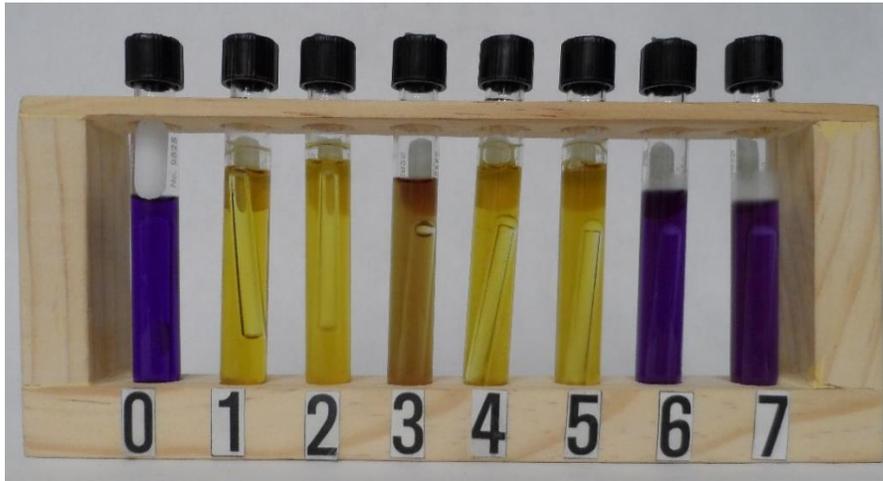
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 51. Zimograma realizado a *C. tropicalis* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 15 del método de conservación.



Fotografía 52. Prueba positiva de viabilidad de *C. tropicalis* en agar Sabouraud en el día 15 del método de conservación.

10.8.3.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 30.



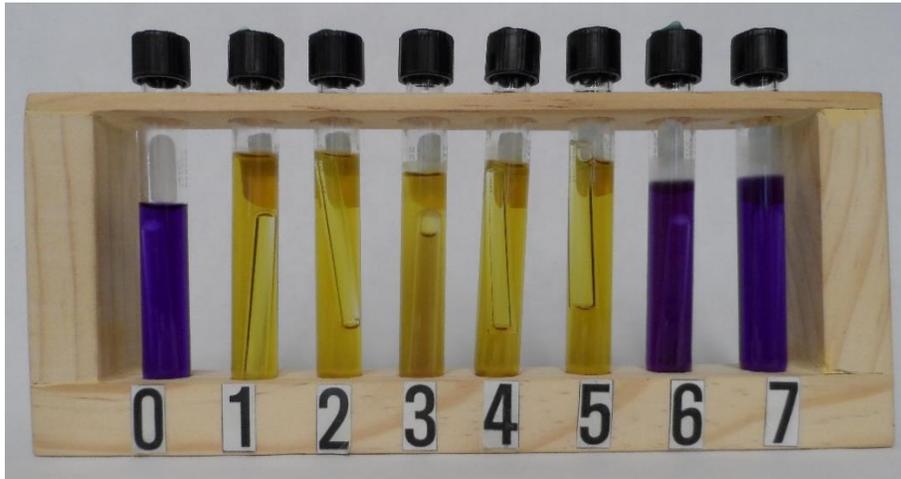
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 53. Zimograma realizado a *C. tropicalis* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 30 del método de conservación.



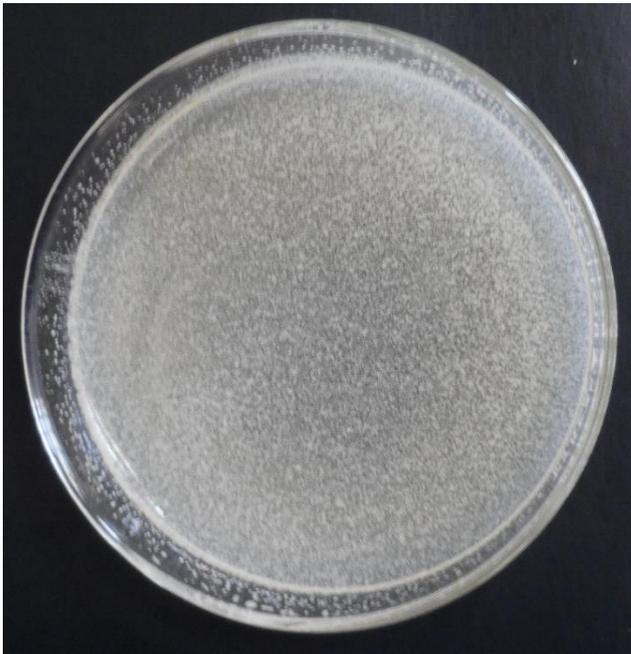
Fotografía 54. Prueba positiva de viabilidad de *C. tropicalis* en agar Sabouraud en el día 30 del método de conservación.

10.8.4.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 60.



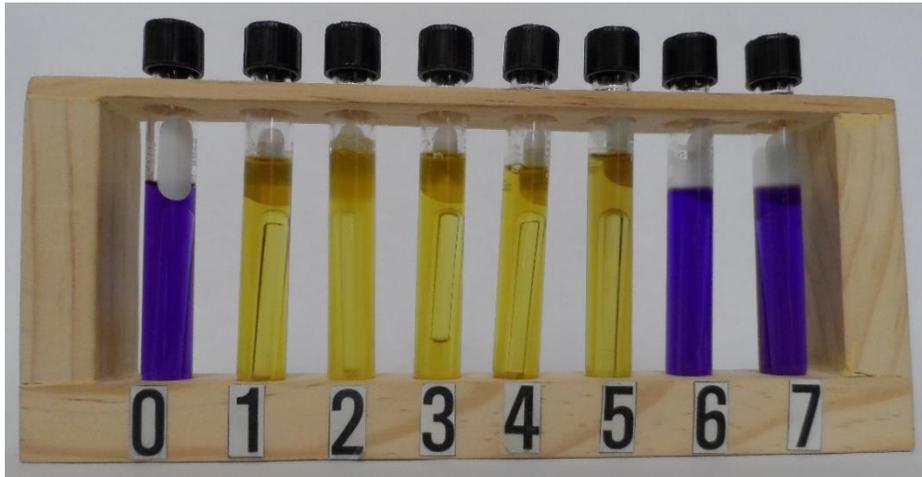
- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 55. Zimograma realizado a *C. tropicalis* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 60 del método de conservación.



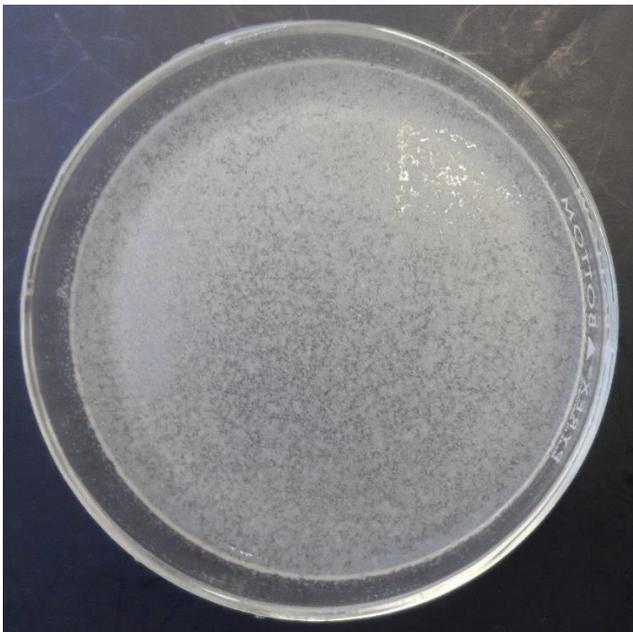
Fotografía 56. Prueba positiva de viabilidad de *C. tropicalis* en agar Sabouraud en el día 60 del método de conservación.

10.8.5.- Prueba de Viabilidad y Fermentación al Día 90.



- 0= control negativo
- 1= Glucosa
- 2= Trehalosa
- 3= Galactosa
- 4= Maltosa
- 5= Sacarosa
- 6= Rafinosa
- 7= Lactosa

Fotografía 57. Zimograma realizado a *C. tropicalis* al día 5 de la prueba, fermentando glucosa, trehalosa, galactosa, maltosa y sacarosa en el día 90 del método de conservación.



Fotografía 58. Prueba positiva de viabilidad de *C. tropicalis* en agar Sabouraud en el día 90 del método de conservación.

11.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado analizaremos los resultados obtenidos de la caracterización de las levaduras de estudio, su viabilidad y su Zimograma realizado durante los 90 días de conservación a -20 °C.

11.1.- Caracterización de las Levaduras

En esta prueba se realizó la caracterización de las levaduras utilizadas (*Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*) por medio del Zimograma (fotografías: 1., 2., 3., 4. y 6.) observándose la fermentación de los diversos carbohidratos empleados, dando como resultado la producción de gas evidenciada con ayuda de la campana de Durham, y la producción de ácidos detectados debido al viraje (pH 6.8 a pH 5.2) del indicador PBC de una coloración púrpura a una coloración amarilla del medio, lo que se interpretan como resultados positivos.

Para el caso de *Candida albicans* (fotografía 4) no fermentó galactosa, siendo este carbohidrato 1 de los 4 carbohidratos que fermenta generalmente; el autor Juan Vilata menciona que la fermentación de este carbohidrato por parte de esta levadura puede ser variable.⁴¹ Se procedió a realizar la prueba de producción de tubo germinativo (fotografía 5) en suero humano, produciéndolo después de dos horas de incubación a 37 °C. Confirmando con esta prueba su identificación.

11.2.- Prueba de Viabilidad

La prueba de viabilidad se realizó durante 90 días de conservación en congelación (- 20 °C) se tomó un capilar de cada una de las levaduras en estudio y se vació directamente el contenido de cada capilar en cajas Petri con agar Sabouraud, incubando a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Candida krusei (fotografías: 10, 12, 14, 16 y 18) y *Candida tropicalis* (fotografías: 50, 52, 54, 56 y 58) no presentaron cambios en su viabilidad durante los 90 días del método de conservación, demostrando que la temperatura de conservación a -20 °C no afectó su viabilidad a los 90 de conservación.

Por otra parte, *Candida glabrata* (fotografía 24), *Candida stellatoidea* (fotografía 34) y *Candida albicans* (fotografía 44) se observó una ligera disminución en sus colonias únicamente en el día 30 del método de conservación, debido a que visualmente sus respectivos capilares contenían una ligera cantidad menor de suspensión de levadura, aunque cabe mencionar que aun así su crecimiento fue muy abundante, pero ligeramente menor en comparación con los demás crecimientos presentados.

Para el día 90 de conservación las 5 cepas de estudio: *Candida krusei* (fotografía 18), *Candida glabrata* (fotografía 28), *Candida stellatoidea* (fotografía 38), *Candida albicans* (fotografía 48) y *Candida tropicalis* (fotografía 58) se puede observar que la temperatura de congelación no afectó la viabilidad de estas cepas, ya que no se observa una disminución evidente en el número de colonias en comparación con el tiempo 0 del método de conservación.

11.3.- Prueba de Zimograma

Candida krusei (fotografías: 9, 11, 13, 15 y 17), *Candida glabrata* (fotografías: 19, 21, 23, 25 y 27) y *Candida stellatoidea* (fotografías: 29, 31, 33, 35, y 37) mantuvieron intacta sus propiedades bioquímicas del Zimograma al fermentar diversos carbohidratos en tiempo y forma.

Candida albicans (fotografía 41) presentó poca fermentación únicamente de la trehalosa al 15 del método de conservación.

Candida tropicalis presentó poca fermentación de la galactosa al 30 del método de conservación (fotografía 53) y también en el día 60 del método de conservación del mismo carbohidrato (fotografía 55).

Las 5 cepas de estudio, *Candida krusei* (fotografía 17), *Candida glabrata* (fotografía 27), *Candida stellatoidea* (fotografía 37), *Candida albicans* (fotografía 47) y *Candida tropicalis* (fotografía 57) mantuvieron su respectiva fermentación en los diversos carbohidratos, demostrando que no se vio afectada su propiedad bioquímica por la temperatura de congelación (-20 °C) durante los 90 días del método de conservación.

11.4.- Comparación con el Método de Conservación Empleado a Hongos Filamentosos

En comparación con el método de crioconservación en capilar para hongos miceliales no patógenos se utilizaron 4 cepas la cuales fueron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum* con la misma temperatura de congelación (- 20 °C) durante 180 días.

Para el caso de *Aspergillus flavus* mostró viabilidad a los 180 días del método de conservación sin observarse cambios en su morfología macroscópica y microscópica. En cuanto a *Aspergillus fumigatus* se conservó en congelación mostrando viabilidad a los 180 días sin mostrar cambios en su morfología macroscópica ni microscópica.

Aspergillus niger se conservó por congelación manteniendo su viabilidad y sin mostrar cambios en su morfología microscópica y macroscópica a los 180 días.

Y por último *Penicillium chrysogenum* presento variabilidad a temperatura de congelación en su crecimiento a partir de los 150 días, dejando de crecer en una de las cajas Petri para este tiempo; a los 180 días permanecieron viables a temperatura de congelación y refrigeración.

Con los resultados obtenidos la temperatura de congelación resultó ser eficiente para la conservación de estos hongos miceliales y para los hongos levaduriformes de este proyecto.

12.- CONCLUSIONES

Se logró conservar en capilar las levaduras: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* por congelación (-20 °C).

Se logró evaluar la viabilidad de las especies del género *Candida* por el periodo establecido a la temperatura de almacenamiento.

Finalmente los resultados indican que se logró establecer un método de conservación sencillo, económico, de fácil almacenamiento y eficiente para conservar microorganismos a -20 °C, por un periodo de al menos 90 días.

13.- REFERENCIAS

- 1.- Arenas R. Micología medica ilustrada. 4ta ed. México: McGrawHill; 2011.
- 2.- 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.
- 3.- López R, Méndez L, Hernández F, Olivares L. Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 3ra ed. México: Trillas; 2012.
- 4.- Tortora GJ, Funke VR, Case CL. Introducción a la microbiología 9a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- 5.- Weng Alemán Z, Esther Díaz RO, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cubana Hig Epidemiol [en línea]. 2005 [fecha de acceso 11 de septiembre de 2015]; 43(3). URL disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032005000300006&lng=es
- 6.- World Federation for Culture Collections. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" [en línea] [Actualización 2012; Consulta 19 de marzo de 2015]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.
- 7.- Snell JJS, Kirsop BE, Doyle A. General introduction to maintenance methods. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 1991:21-30.

- 8.- Metrix Laboratorios. Metrixlab blog [Internet]. México: Metrix Laboratorios; 2013 [consultado 01 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.metrixlab.mx/blog/page/3/>
- 9.- Panizo MM, Reviáka V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2005; 25(1): 35-40.
- 10.- García E. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas [tesis Lic.]. México: UNAM; 2013.
- 11.- Ángel ADI. Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la pontificia universidad javeriana. [tesis]. Bogotá: Pontificia universidad javeriana; 2006.
- 12.- Freire JRJ, Sato ML. Conservación de cultivos de rizobios. Revista Latinoamericana de Microbiología. 1990; (41): 35-41.
- 13.- Fennell D. Conservation of fungous cultures. The Botanical Review. [Internet].1960 [cited 2014 Dec 12]; 26 (1): 79-141. Disponible en: ScienceDirect
- 14.- 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
- 15.- Romero M. Implementación de un método de crioconservación en capilar para hongos miceliales no patógenos [tesis Lic.]. Mexico: UNAM; 2016.

- 16.- Brito GLC, Burguet NL, Sierra PN. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2012 43(3): 1-4.
- 17.- Koneman E, Roberts G. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2012.
- 18.- Ribbons DW. Methods in microbiology. Vol. 3 Newport: Editorial J.R. Norris, Academic Press; 1970.
- 19.- García MD, Uruburu F. Colección española de cultivos. La conservación de cepas microbianas. Bogotá Colombia: Universitat de Valencia; 2000.
- 20.- Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000.
- 21.- Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Revista Argentina de Microbiología. 1998; 30:42-51.
- 22.- Garcia M, Lopez J, Lopez L, Uruburu F. Preservation of microbial strains in the wine industry. Molecular wine microbiology. 2011; 303-318.
- 23.- Rhodes M. Preservation of yeasts and fungi by desiccation. National collection of type cultures. 1948; 35-39.
- 24.- Rehm HJ, Reed G. Biotechnology microbial fundamentals. Vol.1. Alemania: Editorial Verlag Chemie; 1981.
- 25.- 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>

- 26.- Smith D, Onions A. A comparison of some preservation techniques sor fungi. Mycology Soc. 1938; 81 (3): 535-540.
- 27.- Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes-Recent methods. British Mycological Society. 2014; 118: 107-125.
- 28.- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche Y. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiology letters. 2013; 339: 1-9
- 29.- Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginero M, Declerck S, et al. Virality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. BMS promoting fungal science. 2009; 1027-1038.
- 30.- Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003; 46: 205-229.
- 31.- Acosta GA, Agudelo MC, Barrientos SS, Chaves CM, Cuéllar AA, Durán CC, et al. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
- 32.- Ávila PLM, Madero JI, López CB, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de Criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2006; 57 (4): 291-300.
- 33.- Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. J Med Microbiol 1994; 41: 295-310.

- 34.- Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12(1): 80-96.
- 35.- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parvovirus* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 288-305.
- 36.- Lachke SA, Joly S, Daniels K, Soll DR. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. Microbiology 2002; 148: 2661-2674.
- 37.- Kwon-Chung KJ, Hicks JB, Lipke PN. Evidence that *Candida stellatoidea* type II is a mutant of *Candida albicans* that does not express sucrose inhibitable α -glucosidase. Infect Immun 1990; 58 (9): 2804-2808.
- 38- Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Merz WG. Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence for mice. Infect Immun 1988; 56 (7): 1814-1819.
- 39.- Godoy P, Almeida LP, Lopes CA. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico albicans ID. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 197-199.
- 40.- Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, Lanning D, Reynold R, Mielenz J, Eirich D. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. Nat Biotechnol 1992; 10: 894-898.
- 41.- Vilata J. Micosis Cutaneas. España: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 200