

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA VETERINARIA**



**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS DE  
LEVADURA (*Candida guilliermondii*) : LIOFILIZACIÓN Y DISCOS DE PAPEL  
FILTRO**

**ROLAND MAURICIO SUAREZ BELTRÁN**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar por el título de**

**MICROBIÓLOGO AGRÍCOLA Y VETERINARIO**

**Bogotá D.C.  
2010**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS DE  
LEVADURA (*Candida guilliermondii*) : LIOFILIZACIÓN Y DISCOS DE PAPEL  
FILTRO**

**ROLAND MAURICIO SUAREZ BELTRÁN**

**APROBADO**

---

**Roland M. Suarez B.**  
Estudiante

---

**Dr. Gerardo Moreno MSc**  
Director

---

**Dr. David Gómez MSc**  
Evaluador

---

**Dra. Janeth Arias Palacios MSc**  
Directora de Carrera

---

**Dra. Ingrid Schuler PhD**  
Decana Académica

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en los trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar la verdad y la justicia”.

**Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
MARCO TEÓRICO REFERENTES CONCEPTUALES .....	2
Genero <i>Candida</i> .....	2
<i>Candida guilliermondii</i> .....	2
Descripción microscópica y macroscópica. ....	2
Conservación .....	3
Métodos de elección .....	3
Métodos alternativos.....	3
Métodos restringidos .....	3
Liofilización .....	4
Papel filtro .....	4
OBJETIVO .....	5
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos .....	5
METODOLOGIA .....	5
Cepa Inicial .....	5
Método de Liofilización.....	5
Estandarización metodología Liofilización.....	6
Método de Papel Filtro.....	7
Control de Viabilidad.....	8
Prueba patogenicidad <i>Candida guilliermondii</i> .....	8
RESULTADOS/ DISCUSIÓN.....	8
Características Macroscópicas y Microscópicas .....	8
Papel filtro .....	9
Liofilización .....	10
Resultados estadísticos.....	13
Valoración de costos.....	13
CONCLUSIONES .....	14
RECOMENDACIONES .....	14
BIBLIOGRAFIA .....	15

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tinción Gram cepa <i>C. guilliermondii</i> .....	5
Figura 2. Congelador a -80°C.....	6
Figura 3. Liofilizador .....	6
Figura 4. Liofilizador del Centro de Investigaciones Odontológicas PUJ.....	7
Figura 5. Panel de control de liofilizador PUJ .....	7
Figura 6. Cámara refrigerante liofilizador.....	7
Figura 7. Papel filtro impregnado de <i>C. guilliermondii</i> .....	7
Figura 8. Secado papel filtro .....	7
Figura 9. Características Macroscópicas de <i>C. guilliermondii</i> en agar YGC .....	8
Figura 10. Características Microscópicas de <i>C. guilliermondii</i> .....	9
Figura 11. Ningún crecimiento agar YGC .....	9
Figura 12. Tinción Gram confirmativo <i>C. guilliermondii</i> .....	9
Figura 13. Siembra discos papel filtro <i>C. guilliermondii</i> .....	10
Figura 14. Siembra suspensión papel filtro <i>C. guilliermondii</i> .....	10
Figura 15. Gram confirmación morfología de <i>C. guilliermondii</i> .....	10
Figura 16. Liofilizador del Laboratorio de Biotecnología Ambiental UDCA .....	11
Figura 17. Panel de control liofilizador UDCA.....	11
Figura 18. Frascos de Liofilización .....	11
Figura 19. Viales no liofilizados.....	11
Figura 20. Liofilización en forma de pico de flauta .....	11
Figura 21. Total de viales Liofilizados .....	12
Figura 22. Siembra en placa liofilizado de <i>C. guilliermondii</i> en agar YGC .....	12
Figura 23. Siembra en placa liofilizado de <i>C. guilliermondii</i> en agar YGC .....	12

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mezclas de criopreservantes .....	6
Tabla 2. Recuento estandarización de liofilización .....	6
Tabla 3. Recuento de colonias de <i>C. guilliermondii</i> después de una semana de papel filtro.....	10
Tabla 4. Recuento de colonias de <i>C. guilliermondii</i> después de una semana de liofilización .....	12
Tabla 5. Costos liofilización .....	13
Tabla 6. Costos Papel filtro .....	13

## RESUMEN

En los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana se adelanto este trabajo de investigación en el cual se estudio el comportamiento de la levadura *Candida guilliermondii* bajo condiciones de conservación. Se llevo a cabo una estandarización de los criopreservantes utilizados para la conservación como lo son el de liofilización y papel filtro y el análisis de la viabilidad de la levadura. Se realizo una valoración teniendo en cuenta la relación costo/beneficio para la implementación de estos métodos. Se encontró que la combinación de extracto de levadura y leche descremada a 5% y 15% respectivamente en los 2 métodos, realizando la reactivación en caldo YGC por 2 horas y la siembra de la levadura en medios de cultivo YGC, a 37°C durante 3 días encontrando que la conservación mediante liofilización presento mejores resultados en un mediano plazo, que en el papel filtro.

## SUMMARY

In the laboratories of the Pontificia Universidad Javeriana was advanced this research in which study the behavior of the yeast *Candida guilliermondii* under storage conditions. He took out a standardization of criopreservant used for conservation as freeze-drying and filter paper and the viability of yeast. We did a evaluation having into account cost /benefit for implementing these methods. It was found that the combination of yeast extract and skim milk at 5% and 15% respectively gives a good results in both methods, making the recovery in stock YGC for 2 hours and the planting of yeast in culture media YGC, with a 37 ° C of temperature for 3 days finding that conservation by liophilization showed better results in medium time that filter paper.

## INTRODUCCIÓN

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 las disímiles técnicas 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 industria, la docencia y la investigación.

La congelación microbiana es un método físico químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. El microorganismo inmerso en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño. Las sustancias denominadas criopreservantes impiden por interacción molecular con el agua, la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad para las células vivas.

Este trabajo hace parte de un proyecto de investigación del grupo de investigación UNIDIA. En este caso el tema que se desea investigar es la de evaluar las características, propiedades, forma de conservación, antagonismo frente a agentes fitopatógenos y del medio ambiente y funcionalidad en campo de la cepa de *Candida*

*guilliermondii* aislada desde el año 2000 y conservada en medios de cultivo y en un cultivo de Uchuva en la Estación Experimental Javeriana, (Cogua, Cundinamarca).

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el grupo de investigación UNIDIA, de la Pontificia Universidad Javeriana no se encuentran estudios que señalen como la levadura *Candida guilliermondii* se puede conservar para futuros estudios, por lo cual se quiere llevar a cabo un estudio sobre la viabilidad de la cepa mediante 2 métodos de conservación, la liofilización y papel filtro donde se espera se mantenga la cepa sin ningún tipo de alteración y así poder ser usada en estudios e investigaciones posteriores.

## **MARCO TEÓRICO REFERENTES CONCEPTUALES**

### **Genero *Candida*.**

El género *Candida* fue propuesto en 1923 por Berkhout, presentando modificaciones en clasificación debido a composición y definición, este pertenece a la clase *Blastomycetes* donde se encuentran las levaduras imperfectas (asexuales). Puede formar hifas verdaderas o falsas con bastantes células en gemación o blastosporas y puede llagar a formar clamidosporas (Pelczar, 1994). Las especies de *Candida* secretan una gran variedad de sustancias durante el crecimiento, la mayoría de estos son ácidos y alcoholes, una gran parte de la cepas patógenas producen acetoina y otras aminotransferasas (Odds, 1988).

Por otro lado no todas la cepas de una misma especie presentan el mismo nivel de patogenicidad, lo principal para la patogenicidad no es la cepa sino las alteraciones en las defensas celulares del huésped (Lopez C *et al.*, 2005). El genero *Candida* esta formado por mas de 160 especies, donde se consideran patógenas solo 18 encontrando como característica común la ausencia de la forma sexual (Odds, 1988). Las características morfológicas y sexuales permiten identificar el género y las bioquímicas la especie de la levadura, teniendo así características como uso de compuestos carbonados y nitrogenados, crecimiento en 37°C, resistencia a ciclohexamida y el crecimiento en medio sin vitaminas (Beech *et al.*, 1980).

### ***Candida guilliermondii***

La especie *Candida guilliermondii* ha sido aislada de numerosas infecciones humanas principalmente de infecciones cutáneas donde los pacientes se encuentran inmunosuprimidos, esta especie es una levadura emergente que produce fungemia, osteomielitis y peritonitis, y tiene baja sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B presenta variedades entre estas variedades se encuentran *C. guilliermondii* var. *guillemondii*, *C. var. membranifaciens*, (Pinoni *et al.*, 2007) y otras variedades como *C. var. carpophila*, *C. var. japonica*, *C. var. souza* citadas por presentar diferencias en la patogenicidad según la variedad. (Feng *et al.*, 2000).

### **Descripción microscópica y macroscópica**

La coloración de Gram presentó células ovaladas en estado de gemación y teñidas con la coloración como Gram positivas confirmando la presencia de estructuras

levaduriformes. Las colonias en el medio YGC se visualizan como colonias blancas pequeñas, redondeadas, lisas, brillantes, que a medida que pasa el tiempo, toman una forma puntiforme. El medio YGC favorece el crecimiento de esta levadura gracias a su alto contenido de glucosa, y la presencia de Cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias (Pardo *et al.*, 2008). Se realizó una reclasificación de la especie, obteniendo la nueva clasificación de la levadura *Candida guilliermondii* con un 99.7% de certeza generado por API 20C AUX, la patogenicidad de la cepa de *C. guilliermondii* fue determinada como negativa ya que no presenta tubo germinal (Buitrago *et al.*, 2008).

## **Conservación**

Existen diferentes métodos para la conservación de microorganismos. Entre los más conocidos está la congelación de muestras de cultivos a la que se le adiciona un agente estabilizante como glicerol y se mantienen a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La liofilización y la conservación en medios sólidos herméticos son métodos muy aplicados para conservar bacterias; sin embargo, presentan más problemas en el caso de eucariontes ya que muchos de ellos no se recuperan después del tratamiento (Brock, 1997).

Los cultivos herméticos se llevan a cabo en tubos con medio sólido y sembrado por punción cerrándolos herméticamente para evitar desecación, este sistema es útil para procariontes y eucariontes. El método más usado para corto plazo es el mantenimiento en medios generales conservados en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  siendo necesario realizar pases cada 6 meses o según sea la cepa (Brock, 1997).

### **Métodos de elección**

En estos métodos se detiene el crecimiento microbiano sin que se mueran los microorganismos, garantizando la estabilidad genética al evitar la aparición de nuevas generaciones. En este grupo se encuentran la congelación y la liofilización. En los métodos de conservación de microorganismos se buscan principalmente la pureza de la cepa, la sobrevivencia del 70-80% y la estabilidad genética (García *et al.*, 2000).

### **Métodos alternativos**

Son métodos usados cuando la cepa microbiana no soporta los tratamientos de la conservación o la falta de equipos para llevarlos a cabo, es recomendable no usar un solo método alternativo sino realizar varios de estos métodos. Entre estos métodos se encuentran la conservación por transferencia periódica y la conservación en agua destilada (García *et al.*, 2000).

### **Métodos restringidos**

En este grupo se encuentran métodos no usados habitualmente, pero a los que se recurren para conservar microorganismos determinados que no soportan la liofilización o la congelación. Algunos métodos se basan en la parálisis del crecimiento por medio de la eliminación del agua disponible para las células como por ejemplo, desecación en papel filtro, desecación en suelo, arena, desecación en bolas de alginato (García *et al.*, 2000).

## **Liofilización**

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. En este método no hay crecimiento de células puesto que se les quita el agua realizando la parálisis del crecimiento microbiano. Así se consigue una alta estabilidad genética. La liofilización se genera por sublimación del hielo de las células, por lo que debemos realizar una congelación del agua de las células y después eliminarla mediante el vacío sin necesidad de incrementar la temperatura (Safronova *et al.*, 1995).

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de microorganismos, se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío. El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso (Castro *et al.*, 1995).

Las células microbianas sometidas a este tratamiento sufren dos etapas, la congelación y la sublimación del agua. Sin embargo este es un método muy conocido por su comodidad de almacenamiento y manejo de envío de muestras, ya que se pueden almacenar en temperaturas de 18 a 20°C y así su envío es cómodo. Algunos de los crioprotectores recomendados son inositol y leche descremada para bacterias y hongos respectivamente (Zarate *et al.*, 2006) Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunas casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido (Crespo *et al.*, 2000).

En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta (Safronova *et al.*, 1995).

Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%. En general no es posible determinar para cada grupo de organismos el método de conservación ideal, por lo que se trata de emplear el más adecuado. (Castro *et al.*, 1995).

## **Papel filtro**

Se utilizan unos discos de papel filtro bastante absorbente, con poros de de 2 µm (Whatmann nº 3) que se colocan en un sobre de papel aluminio y dentro de cajas de petri correctamente esterilizadas, se realiza una suspensión en solución fisiológica equivalente al patrón número 10 de la escala de Mc Farland (Ramos *et al.*, 2006). A continuación se sumergen los discos en la suspensión por un lapso de 2 min, en cámara de flujo laminar y se secan en estufa a 30°C durante 5min y a continuación son guardados a temperatura ambiente (García *et al.*, 2000).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Comparar los métodos de liofilización y de papel filtro para la conservación de la cepa de la levadura *Candida guilliermondii*.

### Objetivos específicos

- Estandarizar los métodos para la conservación de *Candida guilliermondii*
- Determinar la viabilidad a corto plazo de la levadura *Candida guilliermondii* para los métodos de conservación.
- Determinar los costos de cada método de conservación.

## METODOLOGIA

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, ubicada en la ciudad de Bogotá – Colombia.

### Cepa Inicial

Se partió de un inóculo inicial tomado de una curva de crecimiento de *Candida guilliermondii* en caldo YCG, que se estaba realizando, para obtener diferentes concentraciones de la levadura, necesarias para adelantar otros trabajos de grado, y a las 8 horas de crecimiento, se tomó una muestra de 40 ml de biomasa, que presentó una absorbancia de 0.758 medida en un espectrofotómetro, correspondiente a un patrón de Mc Farland número 8 equivalente a  $2.4 \times 10^9$  UFC/ml determinado previamente. Se realizó una revisión de pureza de la cepa mediante siembra en placa y un extendido revelado con Gram (Fig4), y posteriormente la muestra fue dividida en volúmenes de 30ml y 10ml para cada uno de los procesos de conservación.

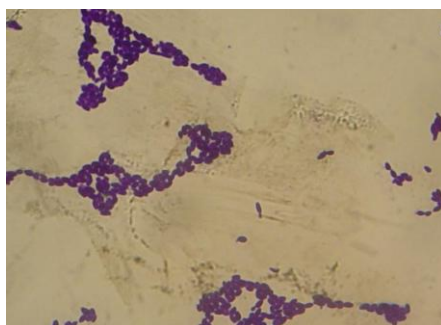


Figura 1. Tinción Gram cepa *C. guilliermondii*

### Método de Liofilización

Del Erlenmeyer se tomaron 30ml que fueron separados en tubos de 16x150 con 1 ml cada uno y centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos llegando a la sedimentación. Se lavaron dos veces con agua destilada, posteriormente fueron colocados en viales

donde se les adiciono los conservantes extracto de levadura (5%) y leche descremada (15%) para ser llevados a congelación a menos  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (Fig5). A continuación fueron colocados en el liofilizador con una generación de la bomba de vacío menor a 13 Pascales y congelación estable de  $-40^{\circ}\text{C}$  (Smith *et al.*, 2001) (Fig6).



Figura 2. Congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$



Figura 3. Liofilizador

### Estandarización de Criopreservantes.

A partir de la suspensión microbiana de levadura de *C. guilliermondii* se prepararon 6 viales que se separaron en 2 viales por tratamiento, para el proceso de liofilización en el equipo del laboratorio del Centro de Investigaciones Odontológicas de la PUJ (Fig1,2,3) donde fueron llevados los viales a un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  con una inclinación de  $45^{\circ}$  para realizar una congelación en pico de flauta para así tener un aumento en la superficie y poder tener una liofilización completa, con 3 tratamientos de criopreservantes (Tabla1) la estandarización se llevo a cabo en el liofilizador del laboratorio de la facultad de Odontología en el Centro de Investigaciones Odontológicas PUJ con una bomba de vacío de  $400 \times 10^{-3}$  mBar lo que en tablas de equivalencia corresponde a 40 Pa lo que se encuentra por encima de lo reportado (Pascales) (1Ba= 100.000Pascales) y temperatura estable de  $60^{\circ}\text{C}$ , y en el de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.) con una bomba de vacío de 12 Pa (Pascales) y una temperatura estable de  $40^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 1. Mezclas de criopreservantes

% v/v	Leche descremada	Extracto de levadura
Tratamiento 1	15%	5%
Tratamiento 2	10%	10%
Tratamiento 3	5%	15%

Tabla 2. Recuento estandarización de liofilización

	Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC	Recuento UFC	Promedio	% Viabilidad
Control	286	257	263	282	272	100%
Tratamiento 1	26	25	22	26	24,75	9,1%
Tratamiento 2	5	10	8	7	7,5	2,8%
Tratamiento 3	5	15	12	6	9,5	3,5%



Figuras 4. Liofilizador del Centro de Investigaciones Odontológicas PUJ



Figura 5. Panel de control de liofilizador PUJ



Figura 6. Cámara refrigerante Liofilizador

### Método de Papel Filtro

Se tomaron 10ml del caldo de crecimiento de 8 horas que fueron colocados en 4 tubos de 16x150 y centrifugados a 4000 rpm llegando a la sedimentación y lavados dos veces con agua destilada. A continuación se les adicionó los conservantes de extracto de levadura (5%) y leche descremada (15%). En condiciones de esterilidad se realizó la inmersión de los discos de papel filtro cualitativo, previamente esterilizados, en la solución preparada y luego del tiempo de 2 min estipulado se retiraron de la solución y se pasaron al proceso de secado por 5 min a una temperatura de 30°C. A continuación fueron colocados en viales, en grupos de 30 discos por vial. previamente esterilizados. (Fig7)



Figura 7. Papel filtro impregnado de *C. guilliermondii*



Figura 8. Secado papel filtro

## Control de Viabilidad

Se realizó una reactivación una semana después de realizado el procedimiento con 1 ml de caldo YGC (cuya composición es en g/L: extracto de levadura 5g, D-glucosa 20g, Cloranfenicol 0.1g, pH final de 6.6 (Merck , 2000) de 2 viales de liofilizado y 2 viales de papel filtro con la cepa de levadura *Candida guilliermondii* por un tiempo de 2 horas.

Posteriormente fue sembrado en superficie, por duplicado, 0.1 ml del reactivado en cajas petri con agar YGC (cuya composición es en g/L: extracto de levadura 5g, D-glucosa 20g, Cloranfenicol 0.1g, agar-agar 15g, pH final de 6.6 (Merck , 2000).

Se llevaron a incubación con 30°C +/- 2 por 3 días para observar el crecimiento de la levadura y a continuación se procede a realizar el recuento de UFC, acompañado de una tinción de Gram para determinar la pureza del conservado y llevar así un control de la viabilidad de cada uno de estos procedimientos (Pardo *et al*, 2008).

## Prueba patogenicidad *Candida guilliermondii*.

La prueba de patogenicidad se realiza con una técnica llamada filamentización en Suero, donde se toma una colonia de la levadura a estudiar con el asa y se siembra en 0.5 ml de suero humano, se incuba a 37°C por 2 horas, al cabo de las cuales, se debe apreciar la formación del tubo germinal sin constricción en el punto de origen y con la forma característica de “espejo de mano”. Estudios realizados por la Universidad Javeriana en el 2008 mostraron que la cepa de *Candida guilliermondii* usada en la Pontificia Universidad Javeriana no presento tubo germinal, por lo que se determina como organismo no patógeno. (Pardo *et al*, 2008).

## RESULTADOS/ DISCUSIÓN

### Características Macroscópicas y Microscópicas

A partir de la suspensión de levadura en caldo YGC, se realizó un aislamiento en agar YGC donde la morfología observada correspondió a colonias de color blanco brillante, pequeñas y lisas, y durante el transcurso del tiempo el tamaño de las colonias aumenta, el desarrollo de la levadura *C. guilliermondii* fue adecuado gracias a la disponibilidad de glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno siendo este un medio apropiado para su crecimiento. (Fig9)

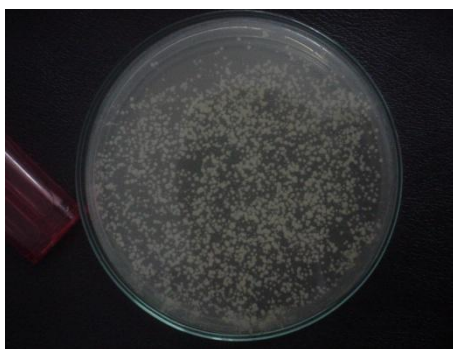


Figura 9. Características Macroscópicas de *C. guilliermondii* en agar YGC

Realizando la tinción de Gram a partir de una de las colonias, se observaron células ovaladas, en estado de gemación lo que nos indica el estado activo de la cepa confirmando la presencia de levadura, teñidas de Gram positivas debido a la gruesa pared celular realizando así la retención del complejo cristal violeta- yodo. (Fig10)



Figura 10. Características Microscópicas de *C. guilliermondii*

### **Papel filtro**

A partir de los viales que contienen los 30 discos de papel filtro cada uno, y mantenidos a temperatura ambiente, se realizó una reactivación de dos viales adicionándole a estos 1 ml de caldo YGC y agitando durante espacio de 2 horas, logrando así una suspensión de la cual se tomó 0.1 ml para ser sembrados en cajas de petri con medio YGC y llevadas a incubadora por un tiempo de 3 días a una temperatura de 30°C +/-2 para realizar el recuento de UFC, teniendo como guía el control que corresponde a la siembra de la suspensión de la cepa de *C. guilliermondii* sin ningún tratamiento.

Durante este tiempo no se produjo crecimiento alguno de la cepa, (Fig11) lo que indico algún inconveniente con el procedimiento, y realizando un extendido con tinción de Gram confirmamos la presencia de levaduras, (Fig12).

Después de este resultado se realizo una siembra de la suspensión por segunda vez y una siembra de los discos papel filtro, para determinar si es más funcional la siembra de los discos (Fig13) o de la suspensión. (Fig14) Posterior a la segunda siembra de la suspensión y de las levaduras se llevo a incubar por 3 días a una temperatura de 30°C +/- 2, encontrando un crecimiento tanto en los discos como en la suspensión y llevando a cabo un extendido con tinción de Gram para la confirmación de la morfología, (Fig15).



Figura 11. Ningún Crecimiento agar YGC



Figura 12. Tinción Gram confirmativo *C. guilliermondii*



Figura 13. Siembra discos papel filtro *C.guilliermondii*



Figura 14. Siembra suspensión papel filtro *C.guilliermondii*



Figura 15. Gram confirmación morfología de *C. guilliermondii*

Tabla 3. Recuento de colonias de *C. guilliermondii* después de una semana papel filtro

	Recuento UFC	Recuento UFC	Promedio	% Viabilidad
Control	273	271	272	100%
	Discos UFC	Suspensión UFC		
Papel Filtro	180	225	202	74%

Estos resultados nos presentan un crecimiento de 202 UFC/ml de viabilidad para el promedio de recuperación por medio de la suspensión y de los discos (Tabla4), dándonos un valor de viabilidad del 74%, lo que nos indica una recuperación que esta dentro de los parámetros requeridos para un procedimiento de conservación.

### Liofilización

Se presentaron inconvenientes con el liofilizador de la PUJ ya que el modelo presente en el laboratorio no permite la programación de la bomba de vacío lo que nos llevo a una lisis de las células por exceso de presión.

Después de una semana de tener los viales a temperatura ambiente se realizó con los viales una reactivación por 2 horas con caldo YGC y una siembra en placa con 0.1 ml en agar YGC llevándolos a incubación durante 3 días a una temperatura de 30°C +/- 2.

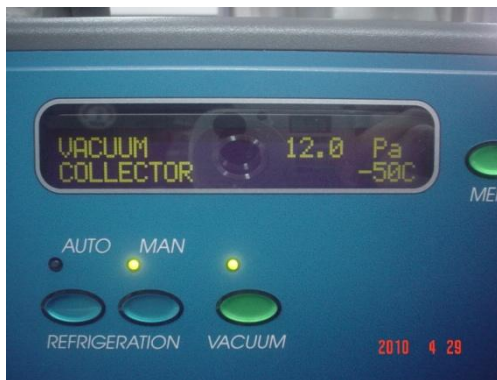
Se encontró que una de las combinaciones de los criopreservantes logro presentar una reactivación del 9.1% con respecto a los otros métodos teniendo como guía el control que corresponde a la siembra de la suspensión de la cepa de *C. guilliermondii* (Tabla2). Siendo este el tratamiento 1 con una combinación de 15% leche descremada y 5% de extracto de levadura.

Con los resultados obtenidos en la estandarización se procedió a realizar la preparación de los 30 viales bajo las concentraciones de 15% y 5% de leche descremada y extracto

de levadura respectivamente, y llevados a liofilización en la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.) dentro del Laboratorio de Biotecnología Ambiental (Fig16,17,18) donde se les realizo una congelación con una inclinación de 45° para lograr una congelación en pico de flauta y así aumentar la superficie de liofilización a una temperatura de -20°C por no poseer un congelador de -80° en el laboratorio, posteriormente fueron llevados al liofilizador donde se programo un vacio de 12 Pa y una congelación de -50°C durante 24 horas teniendo como resultado una liofilización completa de tan solo 11 viales de los 30 enviados, por una descongelación dado que no se logro una pre-congelación a -80°C. (Fig19, 20,21)



Figura 16, Liofilizador del Laboratorio de Biotecnología Ambiental U.D.C.A.



Figuras 17. Panel de control Liofilizador U.D.C.A.

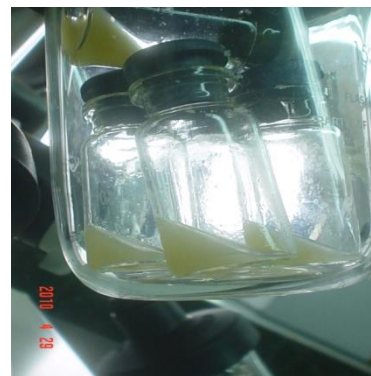


Figura 18. Frascos de liofilización

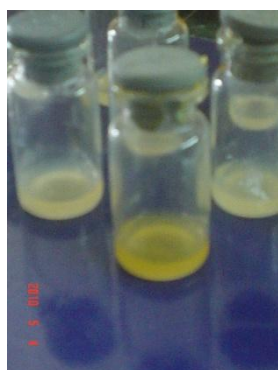


Figura 19. Viales no liofilizados



Figura 20. Liofilización en forma de pico de flauta

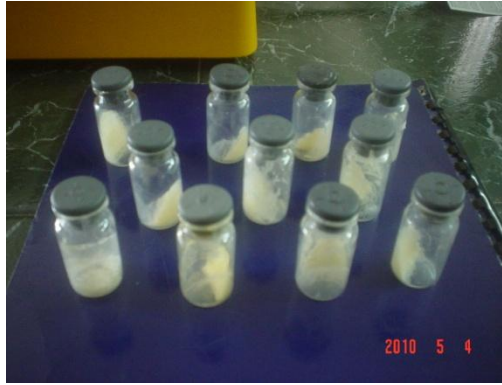


Figura 21. Total de viales Liofilizados

Con los viales conservados a temperatura ambiente durante una semana se realizó una reactivación de la levadura, de dos viales adicionándole a estos 1 ml de caldo YGC y agitando durante espacio de 2 horas, logrando así una suspensión de la cual se tomó 0.1 ml para ser sembrados en cajas de petri por duplicado con medio YGC y llevadas a incubadora por un tiempo de 3 días a una temperatura de 30°C +/-2 para realizar el recuento de UFC, teniendo como guía el control que corresponde a la siembra de la suspensión de la cepa de *C. guilliermondii* sin ningún tratamiento, (Fig22,23) donde la siembra realizada presentó un crecimiento de 251 UFC (Tabla5) de promedio lo que nos equivale a un 92% de viabilidad, presentándonos un muy buen nivel durante el primer mes después del liofilizado.

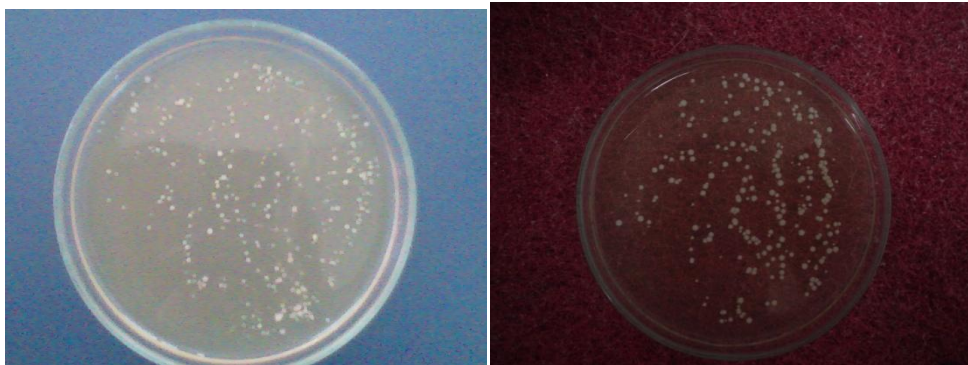


Figura 22, 23. Siembra en placa de liofilizado de *C. guilliermondii* en agar YGC

Tabla 4. Recuento de colonias de *C. guilliermondii* después de una semana liofilización

	Recuento UFC	Recuento UFC	Promedio	% Viabilidad
Control	273	271	272	100%
Liofilizado	296	206	251	92%

## Resultados estadísticos

Con los resultados obtenidos no se puede determinar una metodología estadística debido al número de muestreos que se obtuvieron ya que no son un tamaño de muestra adecuado.

## Valoración de costos.

Durante el procedimiento se fueron valorando los costos de cada método, teniendo en cuenta la relación costo/beneficio, encontrando un método más recomendable para la conservación de la cepa de levadura *Candida guilliermondii* (Tabla 6,7)

Tabla 5. Costos liofilización

Liofilizacion	
frascos (vial)	\$ 10.000
Caldo YGC	\$ 60.000
Medio YGC	\$ 60.000
Leche descremada	\$ 5.000
Uso Liofilizador	\$ 240.000
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 375.000</b>

Tabla 6. Costos Papel filtro

Papel filtro	
Papel filtro	\$ 80.000
frascos (vial)	\$ 10.000
Leche descremada	\$ 5.000
Caldo YGC	\$ 60.000
Medio YGC	\$ 60.000
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 215.000</b>

## **CONCLUSIONES**

- Se determinó que la mejor combinación de criopreservantes fue la del Tratamiento 1 la cual es de 15% y 5% de leche descremada y extracto de levadura respectivamente, con unas condiciones de 12 Pa.
- La viabilidad determinada para los métodos fue del 92% para el liofilizado y del 74% para el papel filtro.
- Se encontró que el método de papel filtro puede llegar a ser un 43% más económico con respecto al liofilizado.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda hacer un seguimiento a las muestras para así determinar la viabilidad a mediano plazo.
- Se recomienda realizar un trabajo paralelo donde se puedan experimentar diferentes presiones generadas por la bomba de vacío.

## BIBLIOGRAFIA

- Abreu, J., Rodríguez, I., Jaqueman, F., Armenteros, T. 2003. Estudio de las condiciones de Liofilización de cepas de levadura. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. C.Habana
- Beech, F.W., Davenport, R., Mossel, D., Dijkmann, K.E., Koopmans, M., Jong, J. & Put, H. 1980. Media and methods for growing yeast: proceedings of a discussion meeting. Second edition. Ed. Academic Press, London. 259 p.
- Brock, T. 1997; Microbiología. Editorial Prentice, Hall Hispanoamericana. S.A. sexta edición Mexico D.F Mexico. 23-28p.
- Buitrago, J., Escobar, A. 2009. Aplicación de levadura *Candida* spp. Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, carrera Microbiología Industrial. Bogota.
- Carrilo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Cap 9. Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias – UNJU. Argentina.
- Castro, H.P., Teixeira, P.M., Kirby, R. 1995. Storage of Lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 172-176
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3872-3875.
- Feng, Y., Liang, H. 2000. Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 50: 417- 422
- Garcia, M., Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Universitat de Valencia*. 30: 12-16.
- Jainiewicz W., Tworkoski T., Sharer C. 2001. Characterizing the mechanism of Biological control of post harvest Diseases on fruit with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. *Phytopathology* 90: 1196-1200.
- Lopez, C. Et al. 2005. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies de género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 16-21.
- Merck. 2000. Manual de medios de Cultivo. Cuarta edición. Darmstadt, Alemania. 1010p

- M.V. Pinoni, V. Castan , M.I. Maegli, J. Lorenzo, F. Frizzera, V. Jewtuchowicz, M.T. Mujica. 2007. Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*. *Revista Argentina de Microbiología* 39: 81-83.
- Odds, F. 1988. *Candida and candidosis*. Segunda edición. Editorial Bailliere Tindall. Londres. 468p.
- Pardo, L. Rubio, L. 2008. Comparación de dos concentraciones de la levadura *Candida guilliermondii* sobre la maduración del banano bocadillo *Musa acuminata* y características organolépticas del fruto. Trabajo de grado (microbiología industrial). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, carrera Microbiología Industrial. Bogotá.
- Pelczar. 1994. *Microbiología*. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. Mexico. 50-80p.
- Ramos, L. Ramadan, S. Lopez, C. Bulacio, L. Mellado, S. 2006. Empleo de discos de papel secante para la conservación de cepas de *Malassezia* spp. *Revista Iberoamericana Micología*. 23: 110-112
- V.I. Safranova, N.I. Novikova. 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing. *Journal of Microbiological Methods* 24: 231-237.
- Sanchez, L. Corrales, L. 2005. Congelacion bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Facultad de Ciencias de la Salud, Colegio Mayor de Cundinamarca. Nova, Vol 3. 109-113.
- Senses-ergul S. Agoston R. Belak A. Deak T. 2005. Characterization of some yeast isolated from foods by traditional and molecular test. *International Journal of Food Microbiology*. Article in press. 35: 14-16.
- Smith, D. Ryan, M. Day, J. 2001. The UK national culture collection (UKNCC) *Biological Resource: Properties, Maintenance and Management*. 98-99p
- Vargas, A. 2002. Caracterización bioquímica de una levadura asociada a tomates heteroinjertados. Trabajo de grado (microbiología industrial). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, carrera Microbiología Industrial. Bogotá.
- Weng, Z. Diaz, O. Alvarez, I. 2005. Conservación de microorganismos. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. *Revista Cubana Higiene, Epidemiología*. Cuba. 43(3)
- Zarate, G. Nader-Macias, M. 2006. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry* 41: 1779-1785.