

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN DE
HONGOS FILAMENTOSOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA
COLECCIÓN DEL LABORATORIO DE QUÍMICA MICROBIOLÓGICA DE LA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**



AUTORES: Jackelyne Camero Rodríguez
María Fernanda Linares Gómez

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
2013**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN DE
HONGOS FILAMENTOSOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA
COLECCIÓN DEL LABORATORIO DE QUÍMICA MICROBIOLÓGICA DE LA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

AUTORES: Jackelyne Camero Rodríguez
María Fernanda Linares Gómez

Dra. Janeth Arias
**DIRECTORA CARRERA DE
MICROBIOLOGÍA**

Dra. Ingrid Schuler
DECANA

Ph.D
ACADÉMICA

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN DE
HONGOS FILAMENTOSOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA
COLECCIÓN DEL LABORATORIO DE QUÍMICA MICROBIOLÓGICA DE LA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

AUTORES: Jackelyne Camero Rodríguez
María Fernanda Linares Gómez

Dra. Jorge Robles
DIRECTOR

Dra. María Ximena
CODIRECTORA

Rodríguez

Dra. Melva Linares
EVALUADORA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
2013**

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946

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

Gracias a Dios por acompañarnos en este proceso de formación y por colocar personas tan valiosas en nuestro camino.

A cada una de nuestras familias quienes estuvieron presentes
Para escucharnos, apoyarnos y aconsejarnos.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jorge Robles por la confianza, el apoyo, el consejo, el conocimiento, la entrega y la paciencia brindada durante este proceso.

A la Doctora María Ximena Rodríguez por su apoyo, conocimiento, dedicación, consejo y entrega con este proyecto.

Tabla de Contenido

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 11 |
| 4. MARCO TEÓRICO..... | 11 |
| 4.1 PÁRAMOS | 11 |
| 4.1.1 <i>Páramo de Guasca</i> | 11 |
| 4.1.2 <i>Páramo de Cruz Verde</i> | 12 |
| 4.2 MICROORGANISMOS..... | 12 |
| 4.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN..... | 13 |
| 4.3.1 <i>Método a corto Plazo</i> | 13 |
| 4.3.2 <i>Métodos a mediano Plazo</i> | 13 |
| 4.3.3 <i>Métodos a Largo plazo</i> | 13 |
| 5. OBJETIVOS..... | 14 |
| OBJETIVO GENERAL | 14 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 6. METODOLOGÍA | 14 |
| 6.1. MICROORGANISMOS DE ESTUDIO: | 14 |
| 6.2. REACTIVACIÓN DE LA CEPA SEGÚN LA PROCEDENCIA DE LA MUESTRA | 14 |
| 6.2.1 <i>Suelo:</i> | 14 |
| 6.2.2 <i>Agua:</i> | 15 |
| 6.2.3 <i>Papel Filtro y Glicerol:</i> | 15 |
| 6.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA: | 15 |
| 6.4 PURIFICACIÓN: | 15 |
| 6.5 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN MICROBIANA: | 15 |
| 6.6. CULTIVOS MONOSPÓRICOS:..... | 15 |
| 6.7. CONSERVACIÓN:..... | 15 |
| 6.7.1 <i>Papel filtro:</i> | 16 |
| 6.7.2 <i>Glicerol:</i> | 16 |
| 6.7.3 <i>Leche Descremada:</i> | 16 |
| 6.7.4 <i>Liofilización</i> | 16 |
| 6.8. MÉTODO DE REACTIVACIÓN | 16 |
| 6.8.1 <i>Papel Filtro:</i> | 16 |
| 6.8.2. <i>Glicerol y Leche descremada:</i> | 16 |
| 6.8.3 <i>Liofilización:</i> | 17 |
| 6.9 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN:..... | 17 |
| 6.9.1 <i>Viabilidad:</i> | 17 |
| 6.9.2 <i>Pureza:</i> | 17 |
| 6.9.3 <i>Estabilidad:</i> | 17 |
| 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 17 |
| 7.1 RECUPERACIÓN AGUA DESTILADA | 17 |
| 7.2 RECUPERACIÓN DEL GLICEROL | 18 |
| 7.3 RECUPERACIÓN DEL SUELO: | 18 |
| 7.4 RECUPERACIÓN PAPEL FILTRO..... | 19 |
| 7.5. EVALUACIÓN DE LAS CONSERVACIONES REALIZADAS..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 7.5.1 Leche Descremada..... | 19 |
| 7.5.2 Glicerol | 20 |
| 7.5.3 Papel Filtro | 21 |
| 7.5.4 Liofilización | 21 |
| 7.6 COMPORTAMIENTO DE CADA UNA DE LAS CEPAS UN MES DESPUÉS DE CONSERVADAS..... | 21 |
| 7.6.1 Cepa 35 <i>Penicillium</i> sp. | 21 |
| 7.6.2 Cepa 41 <i>Aspergillus</i> sp. A2CVSF | 22 |
| 7.6.3 Cepa 57 <i>Aspergillus</i> sp. CV16 | 22 |
| 7.6.4 Cepa 61 <i>Mucor</i> sp. | 22 |
| 7.6.5 Cepa 62 <i>Penicillium</i> CVSF 15..... | 23 |
| 7.6.6 Cepa 66 <i>Penicillium</i> CV 33 | 23 |
| 7.6.7 Cepa 68 <i>Penicillium</i> CV 4 | 23 |
| 7.6.8 Cepa 73 <i>Penicillium</i> 10 CV | 24 |
| 7.6.9 Cepa 74 <i>Penicillium</i> PGSL5..... | 24 |
| 7.6.10 Cepa 77 <i>Penicillium</i> D 10..... | 24 |
| 7.6.11 Cepa 81 <i>Aspergillus</i> A 26 | 25 |
| 7.6.12 Cepa 83 <i>Aspergillus</i> EK2.1 | 25 |
| 7.6.13 Cepa 92 <i>Aspergillus</i> sp. 8..... | 25 |
| 7.6.14 Cepa 93 <i>Aspergillus</i> sp. 9..... | 26 |
| 7.6.15 Cepa 102 <i>Penicillium</i> sp. 4..... | 26 |
| 8 CONCLUSIONES..... | 27 |
| 9 RECOMENDACIONES | 27 |
| 10 BIBLIOGRAFÍA | 28 |
| 11 ANEXOS..... | 31 |
| ANEXO 1 | 31 |
| 1. Preparación medios de cultivo:..... | 31 |
| 2. Preparación Tween 80 al 0,01% (v/v): | 31 |
| 3. Alistamiento de material para conservación en papel filtro..... | 31 |

1. RESUMEN

EL Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ) realizó una colecta de suelo en los páramos de Guasca y Cruz verde en el 2008, a partir de esta colecta se instauró un banco de cepas de hongos filamentosos con posible potencial biotecnológico de los géneros *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Monosporium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Trichoderma* sp., entre otros. Los cuales fueron conservados en cuatro métodos (agua destilada, suelo, papel filtro y glicerol). Dicha colección lleva un periodo de 5 años y no se han realizado pruebas de viabilidad, estabilidad y pureza por lo cual las cepas se están perdiendo.

Por esta razón se evaluaron estas cuatro técnicas de conservación (agua destilada, suelo, papel filtro y glicerol) reactivando 15 hongos filamentosos pertenecientes a los géneros de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y, *Mucor* sp.

A partir de esta recuperación se realizó la purificación y se conservó en cuatro métodos los cuales son glicerol, liofilización, papel filtro y leche descremada además se implementó un POE (Procedimiento Operativo Estándar) para realizar estas conservaciones.

Para esta recuperación se realizó una reactivación de las cepas y se analizó las características macroscópicas y microscópicas las cuales se compararon con la base de datos del laboratorio para verificar que se trataran de las cepas conservadas. Una vez seleccionada la cepa a conservar se realizó una purificación tomando la colonia de interés y realizando un aislamiento en el medio PDA, de estos aislamientos se realizaron cultivos monospóricos con el fin de tener cepas provenientes de un solo propágulo.

Por medio de estos cultivos se realizó una crioconservación cuyo principio es la interrupción del metabolismo microbiano por la congelación de agua disponible (A_w) para el microorganismo, esta técnica se realizó en glicerol y leche descremada. Para esto se tomó 0,5mL de glicerol al 25% y 0.5mL de una suspensión microbiana y se conservó a temperatura de congelación de -20°C (para leche descremada fue el mismo procedimiento).

Para la conservación en papel filtro se tomaron cajas de medio de cultivo PDA y se dispuso la mayor cantidad de cuadrados de 1 cm X 1 cm de papel filtro, sobre cada cuadrante se agregó 20 μL de la suspensión microbiana y se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días. Posterior a su crecimiento se colocaron en una caja de petri vacía estéril para llevar a cabo el proceso de desecación. Finalmente se guardaron en sobres de pergamino y este a su vez en otro sobre de papel y se almacenaron en bolsa ziploc a temperatura de refrigeración.

El último método usado para la conservación fue la liofilización en la cual se agregaron 0.5 mL de leche descremada al 25% y 0.5 mL de la suspensión microbiana en un frasco agrafe ámbar, esto se congeló con nitrógeno líquido durante 10 minutos. Después se llevó al liofilizador el cual por medio de inducción de vacío retira el agua disponible generando una deshidratación, este proceso tuvo una duración de 20 -22 horas. Pasado este tiempo se enviaron a temperatura de refrigeración de 0 a 4°C .

Al mes de conservados los aislamientos se realizó la reactivación de la siguiente manera:

Papel Filtro: Se tomó un papel filtro y se colocó en la mitad de la caja de petri, se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días según el metabolismo del microorganismo.

Glicerol y Leche descremada: Se tomó 20 μL de la suspensión y se inoculó en el centro de la caja de petri, se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días según el metabolismo del microorganismo.

Una vez los microorganismos crecieron, se evaluaron los parámetros de viabilidad, pureza y estabilidad.

Vviabilidad: Se determinó como desarrollo del microorganismo.

Pureza: Se evaluó por medio del crecimiento del hongo conservado, observando una sola morfología.

Estabilidad: Se evaluó observando las características macroscópicas y microscópicas las cuales deben ser iguales a las conservadas.

Para evaluar el proceso de la conservación se planteó la siguiente pregunta:

¿La liofilización, crioconservación y papel filtro son técnicas de conservación que permiten mantener características de viabilidad, estabilidad y pureza en los hongos filamentosos?

De las 15 cepas evaluadas en los métodos utilizados por el laboratorio (glicerol, agua destilada, papel filtro y suelo) se recuperaron ocho cepas del glicerol, cinco cepas de suelo y dos en papel filtro. A partir de estas cepas se llevo a cabo el proceso de conservación en glicerol, papel filtro, leche descremada y liofilización, recuperando tres cepas.

Los métodos utilizados en la última conservación cumplieron con los tres parámetros evaluados: viabilidad, estabilidad y pureza ya que mantuvieron sus características macroscópicas y microscópicas después del mes de evaluado, por lo cual se concluye que se implementó adecuadamente un POE para cada tipo de conservación.

2. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con alto grado de biodiversidad al tener paramos, humedales, selvas tropicales entre otros lugares. Uno de los ecosistemas más estudiados son los páramos ya que son ecosistemas que poseen condiciones extremas como pH, humedad, temperatura; que permiten el desarrollo de cepas específicas (Morales 2007). Estas cepas nativas han permitido desarrollar investigaciones con el fin de conocerlas y mantenerlas por su metabolismo ya que estudios previamente hechos demuestran que microorganismos existentes en estos ecosistemas tienen alta importancia a nivel alimentario, farmacéutico, industrial entre otros.

Por esta razón en el año 2008 el Grupo de Investigación de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, realizó una colecta de suelo con cepas de hongos filamentosos de los Paramos de Cruz Verde y Guasca siendo estos ampliamente estudiados, pues son microorganismos que crecen sobre superficies y requieren contacto con el sustrato por su nutrición heterótrofa, excretan enzimas extracelulares, absorben nutrientes a través de la pared celular y poseen crecimiento apical de sus hifas teniendo la capacidad de generar productos naturales como conservantes, polímeros, agentes químicos, enzimas entre otros (Muhammad et al. 1998, Villena et al. 2003) los cuales son importantes a nivel industrial (Kim et al. 2011, Munkhtar et al. 1998). Este banco de cepas tiene como principio mantener cepas microbianas por cortos o largos plazos con el fin de realizar investigaciones, el objetivo de estas es mantenerla viable, estable y pura.

Esta conservación se realizó en cuatro métodos: Glicerol, papel filtro, suelo y agua destilada y llevan 5 años de conservadas. Lo que se pretende realizar en este estudio es recuperarlas

pues se están perdiendo por el largo tiempo y las condiciones en las que fueron conservadas. Se realizó una nueva conservación en glicerol y leche descremada cuyo principio es paralizar el crecimiento microbiano por no poseer agua disponible para su desarrollo. (Burguet et al. 2012, Hubálek 2003, Gato 2010). Otra técnica utilizada fue la liofilización, que se basa en la ausencia total de agua disponible para el microorganismo, consta de dos etapas: la primera consiste en congelar la muestra aproximadamente a -80°C , la segunda consiste en llevar a cabo un proceso de sublimación por medio de inducción de vacío con el fin de retirar el agua presente en la conservación (Burguet et al. 2012, García et al. 2001). El último método utilizado fue el papel filtro cuyo objetivo es llevar a cabo una desecación usando temperaturas de 35°C (Gato 2010, Weng et al. 2005, Sosa et al. 2011, Crahay et al. 2012, Ramos et al. 2006). Teniendo como objetivo la conservación de quince hongos filamentosos de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica que se encuentran en cuatro métodos de conservación: Papel filtro, glicerol, agua destilada y suelo y conservarlas en leche descremada, liofilización y nuevamente en papel filtro y glicerol.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grupo de investigación de Fitoquímica de la Universidad Javeriana realice una recolecta de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde (Cundinamarca). Esta recolecta permitió establecer un banco de cepas de los géneros de *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Monosporium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. entre otros géneros (Kim et al. 2011, Munkhtar et al. 1998). Este banco se realizó hace cinco años en cuatro métodos de conservación glicerol, papel filtro, suelo y agua destilada.

Debido al largo tiempo y la inadecuada aplicación de las técnicas se estaban contaminando lo que se busca recuperar estos microorganismos ya que se pretende evaluar el potencial biotecnológico evaluando su crecimiento, taxonomía y pruebas moleculares (Kim et al. 2011, Munkhtar et al. 1998).

En este trabajo se va a evaluar cada una de las cepas conservadas y se volverá a crear un banco de cepas utilizando los siguientes métodos de conservación: Glicerol, leche descremada, papel filtro y liofilización y se elaborará un POE para cada uno de ellos con el objetivo de que todas las conservaciones se realicen con un estándar y no exista pérdida de los microorganismos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 PÁRAMOS

Es un ecosistema rico en materia orgánica lo cual favorece las interacciones biológicas, forman archipiélagos con el mar y se desarrollan encima del área de los bosques, contienen una humedad relativa alta por lo cual se denominan esponjas de absorción (Morales 2007, Nieves 1997), poseen condiciones extremas en temperatura, pH, humedad y presión. Estos páramos son reservorios de especies silvestres de hongos.

4.1.1 Páramo de Guasca

Catalogado como páramo bajo por su localización, la temperatura es de 4 a 8°C , su vegetación principalmente gramíneas, arbustos, helechos, líquenes y briofitas (Nieves 1997).

4.1.2 Páramo de Cruz Verde

Se encuentra en el páramo de Sumapaz y tiene el nacimiento del río Fucha, su vegetación predominante son los frailejones y los helechos

4.2 MICROORGANISMOS

La gran mayoría de microorganismos encontrados en los páramos son hongos filamentosos ya que las condiciones que se desarrollan en estos hábitats son toleradas por este tipo de microorganismos. Los géneros que más predominan en esta colección son:

Aspergillus sp.: Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina. Sus estructuras características son la presencia de conidióforos, vesícula, célula conidiogénica denominada fiálide y conidios. Sus colonias son de amarillo verdoso a negra con texturas aterciopeladas o algodonosas en medios utilizados para el cultivo de hongos y levaduras como medio PDA. Este género es ampliamente usado para:

- Generar enzimas como glucanasas las cuales favorecen la degradación de la celulosa y son ampliamente usadas en bioblanqueos, extracción y clarificación de jugos, industrias textiles.
- Posee diferentes ventajas al ser una cepa que se desarrolla rápidamente además de ser un hongo que puede llegar a trabajarse a gran escala (Morales 2007).
- Géneros como *A. oryzae* y *A. niger* tienen la capacidad de generar amilasas las cuales favorecen la degradación del almidón, además de generar ácido cítrico y ácido gluconico (Smith 1996).

Penicillium sp.: Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina. Sus estructuras características son conidióforo simple o ramificado, posee mótula, célula conidiogénica fiálide, conidios los cuales se producen en cadenas basipétalas, pueden llegar a ser verticilado, diverticilado, triverticilado y tetraverticilado. Generalmente poseen una textura aterciopelada (Franco 2010). A nivel industrial este género ha sido ampliamente estudiado por:

- *P. roquefortii* es utilizado para la maduración de quesos (Smith 1996).
- *Penicillium* sp. genera productos importantes en la salud humana como antibióticos, antitumorales e inmunopresores.
- *A. griseofulvum* produce la griseofulvina como antifúngico (Smith 1996).

Mucor sp.: Pertenece a la división Zygomycotina, sus estructuras características son esporangióforo ramificados o simples, esporangiosporas demateáceas, columnella ovoide. Sus usos a nivel industrial son:

- Promotor de β -carotenos. Este hongo tiene la capacidad de acumular los β -carotenos y de producirlos usando sustratos como zeaxantina y β criptoxantina, Por lo cual se han hecho pruebas moleculares identificando que un gen es el causante de esta acumulación (Csernetics et al. 2011).
- Se ha encontrado también la capacidad de *Mucor circinelloides* para utilizar N-acetil-D-glucosamina y la quitina como fuente de carbono y generar etanol siendo una producción de bioetanol teniendo esta cepa un gran potencial (Inokuma 2013).

Al tener estos microorganismos un potencial biotecnológico es imprescindible conservarlos apropiadamente para mantener sus características metabólicas, además de sus características

morfológicas y genéticas, para tal fin se han desarrollado métodos de mediano y largo plazo los cuales se clasifican según el tiempo de conservación.

4.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

4.3.1 Método a corto Plazo

Este método consiste en conservar el microorganismo como un cultivo activo por medio de repiques. Este método no es aconsejable ya que ocasiona modificaciones genéticas y se contamina más fácilmente además tiene un periodo de tiempo de una semana a dos meses (Ángel 2006, Gato 2010).

4.3.2 Métodos a mediano Plazo

Este método de conservación se realiza en papel filtro, sílica gel, agua destilada y aceite mineral entre otros. El método utilizado con mayor frecuencia es la desecación en papel de filtro (Gato 2010, Weng et al. 2005); esta conservación se realiza inoculando en papel filtro una suspensión microbiana con una concentración de 10^7 a 10^8 propágulos/mL, esta inoculación tiene como objetivo crecimiento uniforme sobre el papel. Posterior a ello se retira el papel y se envía a secar a 35°C. Una vez seco el papel filtro se almacenan a temperatura de refrigeración de 0 a 4°C (Sosa et al. 2011, Crahay et al. 2012, Ramos et al. 2006).

4.3.3 Métodos a Largo plazo

Este método consiste en paralizar el crecimiento microbiano por la ausencia de agua disponible para su desarrollo. Existen dos métodos: congelación y liofilización, tiene una duración de 10 años (Burguet et al. 2012, Gato 2010).

Para llevar a cabo estas conservaciones se requiere tener en cuenta:

- La edad de las células ya que se busca que éstas se encuentren en la fase exponencial de crecimiento.
- La velocidad de congelación debe ser de manera rápida para que evite la formación de cristales.
- La temperatura de almacenamiento tiene que ser debajo de -20 °C para crioconservación y de 0 a 4°C para la liofilización y el papel filtro.
- El uso del agente crioprotectante depende de la célula microbiana que se va a crioconservar (Gato 2010)

4.3.3.1 Congelación

Es una técnica donde se utiliza una suspensión microbiana cuya concentración es de 10^7 a 10^8 propágulos/mL y la cual se congela a -20 °C. A esta suspensión microbiana se le adiciona un agente crioprotector con el fin de evitar el daño en la célula. Los crioconservantes más usados son: lactosa, sacarosa, inositol, leche descremada, glicerol y dimetilsulfóxido (García et al. 2001). El dimetilsulfóxido y el glicerol son ampliamente utilizados en células eucariotas (Hubálek 2003). El glicerol penetra de manera intra y extracelular, es altamente hidrofílico lo cual favorece los puentes de hidrógeno evitando la formación de cristales, desecación, destrucción y radiación térmica además disminuye el punto de congelación permitiendo una congelación rápida (Hubálek 2003, García et al. 2001, Gato 2010).

4.3.3.2 Liofilización

En este método consta de dos etapas; la primera consiste en realizar una suspensión microbiana cuya concentración es de 10^7 a 10^8 propágulos/mL y adicionar un agente crioconservante con el fin de evitar algún daño en la célula, el más utilizado en hongos filamentosos es la leche descremada la cual evita la formación de cristales y el daño de la célula no se utiliza glicerol ya que es viscoso y es muy difícil retirar el agua y no se utiliza dimetilsulfóxido porque la concentración de vapor llega a ser tóxica para el microorganismo, esta suspensión se congela aproximadamente a -80°C . La segunda etapa consiste en llevar a cabo un proceso de sublimación por medio de inducción de vacío retirando el agua presente en la suspensión, esto se realiza en un equipo denominado liofilizador (Burguet et al. 2012, García et al. 2001, Gato 2010, Hubálek 2003).

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar la conservación de quince hongos filamentosos de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica que se encuentran en cuatro métodos de conservación: Papel filtro, glicerol, agua destilada y suelo y conservarlas en leche descremada, liofilización y nuevamente en papel filtro y glicerol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un POE'S para cada uno de los métodos de conservación usados en las quince cepas de filamentosos del Laboratorio de Química Microbiológica.
- Comparar los métodos de conservación de agua destilada, glicerol, suelo y papel filtro, utilizados en la colección de microorganismos del Laboratorio de Química Microbiológica con el fin de evaluar estabilidad, viabilidad y pureza entre estos.
- Evaluar los cuatro métodos de conservación; los dos implementados y los dos existentes con el fin de corroborar si se realizó la conservación adecuadamente.

6. METODOLOGÍA

6.1. Microorganismos de estudio:

Se seleccionaron 15 aislamientos: 6 *Aspergillus* sp., 8 *Penicillium* sp., 1 *Mucor* sp., que se encontraban conservados en agua destilada, glicerol, papel filtro y suelo de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.2. Reactivación de la cepa según la procedencia de la muestra

Se realizó la siembra directa en agar PDA (Anexo 2 numeral 1) de los quince hongos filamentosos que se encontraban conservadas en los métodos anteriormente mencionados.

6.2.1 Suelo:

Se tomó aproximadamente 1 gramo de suelo con ayuda de una pinza y se colocó en cada extremo de la caja de petri. Se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días.

6.2.2 Agua:

Con una micropipeta se adicionó 0,2 µL de agua destilada a cada extremo de la caja. Se envió a incubar a 25 ° C de cinco a siete días.

6.2.3 Papel Filtro y Glicerol:

Se tomó el papel filtro o disco (en el caso de la conservación en glicerol) y se colocó en cada extremo de la caja. Se envió a incubar a 25° C de cinco a siete días.

6.3 Caracterización morfológica:

Se efectuaron resiembras en los medios PDA y Czapeck con el fin de evaluar características morfológicas macroscópicas y microscópicas y se determinó si lo conservado correspondía al código asignado en el banco de cepas de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.4 Purificación:

De los quince aislamientos obtenidos se tomó un morfotipo que tuviera características similares a las explícitas en la base de datos del Laboratorio de Química Microbiológica y que se evidenciara en los cuatro métodos de conservación. Con la aguja de disección se tomó el borde de la colonia y se sembró por punción central en medios PDA y Czapeck, se utilizaron estos dos medios de cultivo ya que la base de datos reportaba las características de los microorganismos en esto. Se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días analizando características macroscópicas y microscópicas comparándolas con las existentes en la base de datos. Una vez purificado el microorganismo se preparó la suspensión microbiana, para esto se realizó un desprendimiento de conidios con Tween 80 al 0,01%.

6.5 Preparación de la suspensión microbiana:

Se tomó 10 mL de Tween 80 al 0.1% v/v (Anexo 1 numeral 2) y se agregaron a la caja de petri con el hongo crecido. Se realizó un desprendimiento de propágulos usando la aguja de disección curva, y se transfirió a un tubo nuevo.

6.6. Cultivos monospóricos:

A partir de la suspensión microbiana se hizo el conteo de propágulos en cámara de Neubauer y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración <100 propágulos/mL. A partir de esta dilución se sembró en superficie 0.1mL de la suspensión de propágulos en medio PDA, luego se incubó a 25°C de uno a tres días según el metabolismo del microorganismo. Cuando se observó crecimiento, se tomó una colonia y se realizó una siembra en medio PDA por punción central con ayuda de la aguja de disección (Se realiza para las 15 cepas de hongos filamentosos).

6.7. Conservación:

A partir de los cultivos monospóricos de las quince cepas de hongos filamentosos se realizó la conservación en cuatro métodos: Liofilización, leche descremada y nuevamente en papel filtro y glicerol; estos tendrán una evaluación periódica al mes, a los tres, seis y doce meses de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del microorganismo, además se evaluará el tiempo de conservación de cada método.

6.7.1 Papel filtro:

En las cajas de petri con medio PDA ya servido se dispuso la mayor cantidad de cuadros de papel filtro (anexo 2 numeral 3) en condiciones asépticas. Sobre cada cuadrado se adicionó 0.2 μ L de la suspensión del microorganismo. Se envió a incubar a 25 °C de cinco a siete días. Una vez crecido el hongo, con una pinza se tomaron cada uno de los cuadrantes y se pasaron a una caja de petri vacía previamente esterilizada, se colocó el papel de manera que el hongo quedara en la parte anterior y se llevaron a secar a 35 °C de cinco a siete días. Cuando el papel estaba totalmente seco se colocó en sobres de pergaminos, estos se introdujeron en un sobre de papel Kimberley, se envolvieron en vinipel y aluminio y se guardó en una bolsa ziploc. Se envió a temperatura de refrigeración de 0 a 4°C (Sosa et al. 2011, Crahay et al. 2012, Ramos et al. 2006).

6.7.2 Glicerol:

Se tomó 50 mL de Glicerol al 100 % (v/v) y se adicionó a 200 mL de agua destilada, obteniendo una concentración del 25% (v/v), se envió a esterilizar a 121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (psi). Éste crioconservante se utiliza en un rango de 10 al 20%(v/v) ya que si supera esta concentración llega a ser toxica para el microorganismo, en este caso 25% (v/v) es la concentración inicial de la cual se utiliza 0.5 mL y se adicionan a 0.5mL de la suspensión microbiana realizando una dilución obteniendo una concentración de 12,5% (v/v) (anexo #). Esta suspensión se congela a -20°C (Hubálek 2003, Gato 2010).

6.7.3 Leche Descremada:

Se tomaron 50 gramos de leche descremada y se adicionaron a 200 mL de agua destilada obteniendo una concentración del 25% (p/v). Se envió a esterilización a 121°C por 7 minutos a 7 libras de presión por pulgada cuadrada (psi). Se sirvió 0,5 mL de leche descremada al 25% (p/v) a un eppendorf de 1,5 mL, se agregó 0,5 mL de la suspensión del microorganismo. Se congelo a -20°C. (Hubálek 2003, García et al. 2001, Gato 2010).

6.7.4 Liofilización

Se sirvió 0,5 mL de la suspensión microbiana en frasco agrafe ámbar que contenía 0,5 mL de leche descremada al 25 % (p/v), se le colocó un tapón de algodón, se cubrió con papel kraf y se aseguraron con pita. Esto se congeló con nitrógeno líquido durante 10 minutos. Luego se colocaron en el liofilizador el cual por medio de inducción de vacío realiza una sublimación, esto se llevo a cabo en un equipo llamado liofilizador (aproximadamente de 20 a 22 horas). Finalizado el proceso se retiró la pita, el papel kraf y el tapón de algodón y se colocó un tapón de caucho, luego se le colocó la grapa y se sella. Se conservan a temperatura de refrigeración de 0 a 4°C (Burguet et al. 2012, García et al. 2001, Gato 2010, Hubálek 2003).

6.8. Método de reactivación

6.8.1 Papel Filtro:

Se tomó un cuadrado de papel filtro y se colocó en la mitad de la caja de Petri de medio PDA, se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días (varía según el metabolismo del microorganismo).

6.8.2. Glicerol y Leche descremada:

Se tomo 2 μ L de la suspensión conservada en glicerol o leche descremada y se inoculó en el centro de la caja con medio PDA, se envió a incubar a 25°C de cinco a siete días (varía según el metabolismo del microorganismo).

6.8.3 Liofilización:

Se limpia la grapa del frasco ámbar con alcohol, luego se levanta parte de la grapa y con una aguja de insulina, se agrega 1 mL de Tween 80 al 0,1% (v/v) y se agita hasta homogenizar la muestra. Se trasfiere a un tubo 13x100 mm previamente esterilizado. A partir de este tubo se tomara 0,2 µL y se inocula en el centro de la caja de petri con medio PDA (Este procedimiento no se realizo ya que la conservación no cumplió el tiempo para realizar la lectura).

6.9 Evaluación de los métodos de conservación:

Se realizaron con el fin de determinar el porcentaje de viabilidad, la estabilidad y la pureza de las conservaciones, se evaluó al primer mes.

6.9.1 Viabilidad:

Se evaluó por el desarrollo del microorganismo es decir: creció es viable.

6.9.2 Pureza:

Se evaluó por medio del crecimiento del hongo conservado, observando una sola morfología.

6.9.3 Estabilidad:

Se evaluó observando las características macroscópicas y microscópicas las cuales deben ser iguales a las conservadas.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la recuperación de las 15 cepas del Laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana provenientes del Páramo de Guasca y Cruz Verde que se encontraban en agua destilada, glicerol, papel filtro y suelo que llevaban 5 años conservadas y los resultados fueron:

7.1 Recuperación agua destilada

Se realizo la recuperación de los quince hongos filamentosos que se encontraban en agua destilada, se observo que el 100% presento contaminación bacteriana (figura 1). Panizo (2005) realizo un estudio con cepas filamentosas y afirma que el método es efectivo si se realiza un control riguroso de subcultivos como mínimo cada año, en los cuales se analizan características morfológicas y fisiológicas. Esta contaminación pudo generarse porque la muestra inicial no se encontraba pura, no se realizaron subcultivos ni seguimiento a las conservaciones, se tomo como un método a largo plazo ya que se conservo por 5 años. No se evidencio crecimiento filamentoso en ninguno de los aislamiento ya que estas conservaciones se encontraban en temperatura de congelación y al no tener un agente crioconservante generó la formación de cristales y el rompimiento de las células causando la muerte celular y como se mencionó anteriormente porque es un método a corto plazo (una semana a un año) y se empleo como un método a largo plazo. En este caso se descartaron todas las muestras.



Figura 1. Recuperación de agua destilada

7.2 Recuperación del glicerol

Se realizó la recuperación de los quince hongos filamentosos que se encontraban en glicerol, se recuperaron ocho microorganismos el resto presentó contaminación y otros no se evidenció crecimiento (figura 2).



Figura 2. Recuperación del Glicerol

En las cajas que se observaron crecimiento permite asegurar que el agente crioconservante usado y la técnica son adecuadas para la conservación a largo plazo, Crahay (2012) expone que el glicerol es un excelente crioconservante el cual no reporta ningún efecto tóxico por lo cual la viabilidad no se ve afectada permitiendo una recuperación satisfactoria. En las cajas que se observó contaminación puede darse porque la suspensión inicial venía contaminada, las condiciones de asepsia no fueron las apropiadas existiendo en el cuarto de siembra esporas o conidios que llegaron de manera indeseada. Y finalmente en las cajas donde no se observó crecimiento lo que pudo ocurrir fue el uso inadecuado del crioprotectante genero la formación de cristales y ocasiono daño en las células, otro aspecto es que la concentración de glicerol usada no se encontraba entre el 10% - 20% (v/v) lo cual llevo a que fuera tóxico para el microorganismo, otra razón es que las células se tomaron en una etapa inadecuada es decir no se tomó al final de la fase exponencial donde se produce obtiene la mayor esporulación por lo cual la concentración del inóculo era baja y genero pérdida en la viabilidad (Morris et al. 1988, Smith 1993, Smith 1996, Tanghe et al. 2003).

7.3 Recuperación del Suelo:

Se realizó la recuperación de los quince hongos filamentosos que se encontraban en suelo, se recuperaron cinco microorganismos el resto presentó contaminación (figura 3).



Figura 3. Recuperación del Suelo

Henao (2006) afirma que la conservación en suelo es una técnica efectiva para hongos filamentosos en comparación con el agua destilada, esto se debe a que los conidios poseen afinidad con los agregados del suelo. En las cajas que observamos crecimiento filamentoso sin contaminación indica que el método de suelo es adecuado y que la esterilización de este se realizó adecuadamente. En las demás cajas que se observó contaminación con otros hongos filamentosos lo que ocurrió fue que no se esterilizó adecuadamente el suelo permitiendo que en los agregados permanecieran conidios de diferentes géneros evidenciándose crecimiento de diferentes morfologías (Henao 2006).

7.4 Recuperación papel filtro

Se realizó la recuperación de los quince hongos filamentosos que se encontraban en papel filtro, se recuperaron dos microorganismos el resto presentó contaminación bacteriana y en otros no se observó crecimiento (figura 4).



Figura 4. Recuperación papel filtro

En los dos aislamientos recuperados se cumplió el fundamento de la prueba el cual es realizar una desecación total, el inoculo se encontraba puro y la temperatura de almacenamiento era de 20° C. Parra (2006) y Sosa (2001) exponen que el método de conservación de papel filtro se realiza a mediano plazo teniendo porcentajes de viabilidad > 90% y que algunas cepas conservan sus factores de virulencia en periodos superiores a 4 años. En los aislamientos donde se observó crecimiento bacteriano lo que ocurrió fue que el inoculo utilizado no se encontraba puro, el manipulador no llevó a cabo una buena asepsia, no se realizó la conservación adecuadamente ya que los cuadros de papel filtro se encontraban húmedos generando el desarrollo de diferentes microorganismos ya que había agua disponible para su desarrollo. En el caso de las cajas que no se observó crecimiento lo que sucedió fue que la temperatura de almacenamiento fue la inadecuada, como lo reporta la técnica la temperatura de almacenamiento es de 0 a 4°C (Sosa et al. 2011, Crahay et al. 2012, Ramos et al. 2006) y estos se encontraron a -20° C, al no tener un agente crioconservante se generaron cristales y causaron el daño de las células ocasionando la muerte celular. De los aislamientos recuperados se realizaron las conservaciones en leche descremada, glicerol, papel filtro y liofilización. Al mes de conservadas se evaluaron y los resultados fueron:

7.5. Evaluación de las conservaciones realizadas

7.5.1 Leche Descremada

Esta técnica es ampliamente usada en hongos filamentosos, se sugiere utilizar el medio Skim Milk por su composición y pureza. En la conservación realizada se perdieron dos aislamientos el número 35 y el 102 pertenecientes al género *Penicillium* sp., debido a que existió contaminación en el inóculo al observar crecimiento mucosal y detectado por una tinción con lactofenol que permitió observar estructuras de *Mucor* sp. Se afectaron estos dos aislamientos ya que diariamente se trabajan dos microorganismos y se agruparon por género, la cepa 35 y 102 pertenecen al género *Penicillium* sp. *Mucor* sp. es un contaminante de laboratorio. Una de las causas de contaminación pudo deberse, a que las propiedades nutricionales de la leche favorecen el desarrollo de diferentes microorganismos, si no se mantienen condiciones de asepsia en este caso se trabajaron estos dos microorganismos el mismo día lo cual indica que no se realizó una correcta desinfección de la cabina y existieron esporas de *Mucor* sp. que llegaron al inoculo.

De las quince cepas trabajadas se recuperaron todas indicando que hay un porcentaje de viabilidad del 100%. De las quince cepas se observó contaminación con colonias satélites en tres cepas de las trece recuperadas en este caso el inoculo está puro, lo que se propone es realizar una correcta desinfección de la cabina antes de realizar la reactivación para asegurar el

crecimiento del microorganismo conservado. Para visualizar el comportamiento de los quince hongos filamentosos en esta conservación se realizó un conteo inicial y posterior a esto se realizaron las conservaciones, al mes de lectura se realizó un nuevo recuento con el fin de realizar una aproximación de la tendencia de estos microorganismos (figura 5)

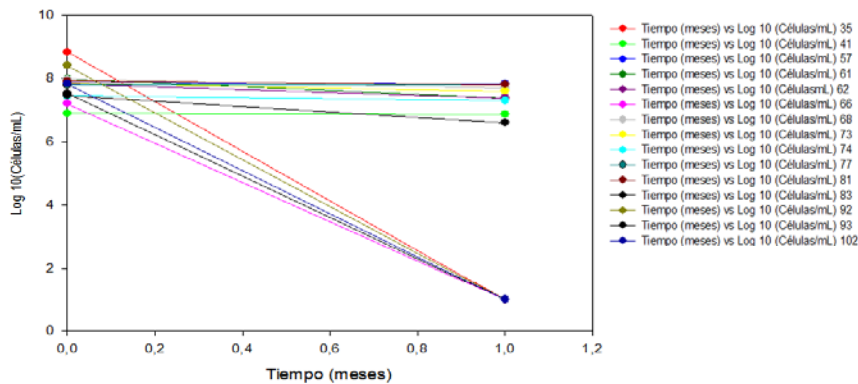


Figura 5. Linealización de crecimiento trascurrido un mes de conservado en glicerol

En la figura 5, se observa que la cepa 35 y 102 no presentan recuento pues se encontraban contaminadas desde el inculo y en el caso de las cepas 66, 83 y 92 presentaron colonias satélites por lo cual no se pudo realizar el recuento. Por esta razón solo se tuvo en cuenta la tendencia en 10 aislamientos los cuales permitieron realizar un conteo. En este caso la conservación es buena ya que permitió una recuperación adecuada. Respecto a la pureza de las quince cepas diez se encontraron puras obteniendo un porcentaje del 66 % y finalmente en estabilidad de las quince cepas mantuvieron las características macroscópicas y microscópicas a la cepa conservada.

7.5.2 Glicerol

Para esta técnica tampoco fue posible obtener aislamientos puros de las cepas 35 y 102 pertenecientes al género *Penicillium* sp., debido a las mismas causas descritas anteriormente. Para determinar la concentración inicial de cada una de las cepas, se realizó un conteo en cámara de Neubauer; igualmente, se hizo un conteo al mes de conservadas las cepas con el fin de analizar la tendencia que se llevó a cabo en la conservación (figura 6).

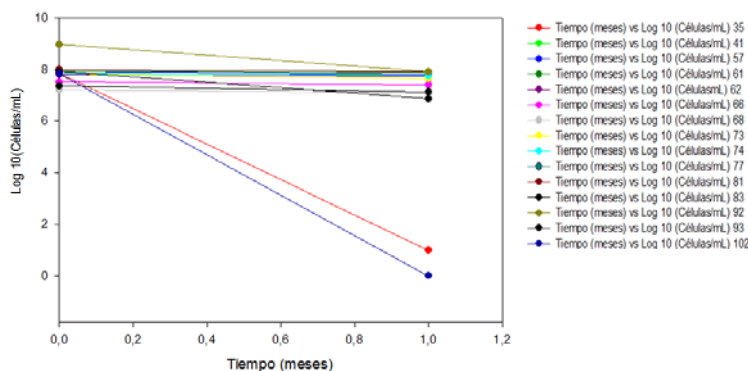


Figura 6. Linealización de crecimiento trascurrido un mes de conservado en glicerol

En la figura 6 se observa que dos cepas se perdieron al mes de conservadas, debido a contaminación con otros microorganismos, que no permitió realizar un recuento. Para este

método de conservación, las quince cepas fueron viables y estables; mientras que trece de ellas estaban puras. En esta conservación se utilizó una concentración de glicerol del 25% (v/v) como inicial ya que al realizar la conservación se llevó a un volumen final de 1 mL generando una dilución obteniendo una concentración final del 12,5% (v/v) siendo este porcentaje adecuado para la conservación.

7.5.3 Papel Filtro

En este método de conservación, se presentaron los mismos inconvenientes descritos para el método glicerol. No se presentaron diferencias entre estos dos métodos, como se observa en la figura 7.

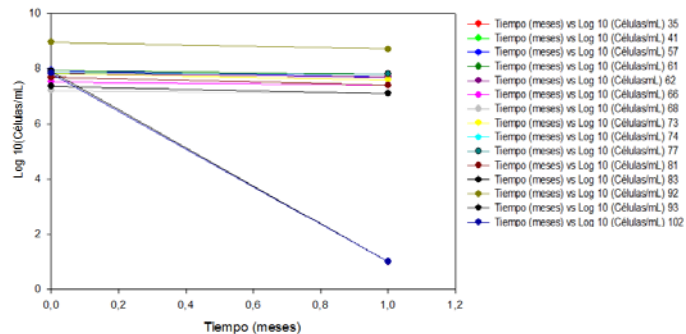


Figura 7. Linealización de crecimiento transcurrido un mes de conservado en papel filtro

7.5.4 Liofilización

En este caso se realizó la conservación como se describió en la metodología pero no cumplió el tiempo de evaluación de un mes por lo tanto no se realizó la reactivación.

7.6 Comportamiento de cada una de las cepas un mes después de conservadas

7.6.1 Cepa 35 *Penicillium* sp.

Sus características macroscópicas son centro blanco, periferia azul oscura y borde blanco, textura algodonosa (anexo 1 tabla 1). Como se observa en la figura 8 todas las conservaciones presentan contaminación con un mucoral ya que se realizó una microscopia observando estructuras propias de ese *Mucor* sp., esto se debe a que la suspensión venía contaminada generando crecimiento donde se agregó el inóculo mas no se desarrollaron como colonias satelitales, esta contaminación se debe a que la suspensión se contaminó con esporas de *Mucor* sp., también pudo ser causada por una mala manipulación con las puntas y la micropipeta. Además se ha reportado que este es contaminante común del laboratorio lo cual puede ser un factor en contra.

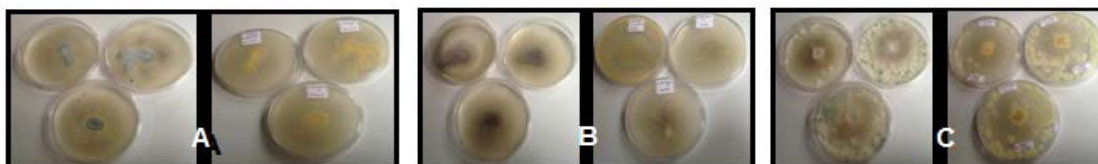


Figura 8. Conservación cepa 35 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.2 Cepa 41 *Aspergillus* sp. A2CVSF

Las características macroscópicas son colonias amarillas, con textura aterciopelada (anexo 1 tabla 2).

Se realizó caracterización macroscópica (figura 9) observando colonias con las mismas características a la conservada, la microscopía permaneció igual, el microorganismo creció por lo cual los métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad. Según sus características microscópicas, microscópicas y estudios previos puede tratarse de *Aspergillus terreus* para asegurar esto es necesario realizar pruebas moleculares.

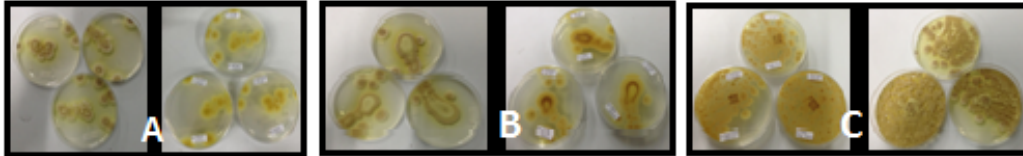


Figura 9. Conservación de la cepa 41(A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.3 Cepa 57 *Aspergillus* sp. CV16

Las características macroscópicas son colonias verde oscuro con periferia blanca y textura pulverulenta (anexo 1 tabla 3). Se evidencio crecimiento, se realizó caracterización macroscópica (figura 10) y microscópica las cuales permanecieron igual a la conservada, por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

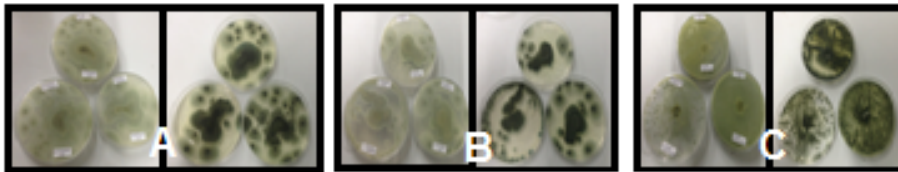


Figura 10. Conservación cepa 57(A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.4 Cepa 61 *Mucor* sp.

Sus características macroscópicas son colonias grisáceas con micelio aéreo negro y textura algodonosa (anexo 1 tabla 4). En la figura 11 se observan las características macroscópicas y microscópicas las cuales permanecieron intactas a las conservadas, el microorganismo creció óptimamente por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

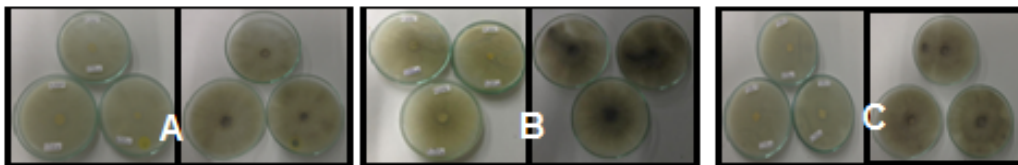


Figura 11. Conservación cepa 61 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.5 Cepa 62 *Penicillium* CVSF 15

En sus características macroscópicas presenta colonias con textura pulverulenta, color verde oscuro con borde blanco además genera pigmentos difusibles al medio amarillo (anexo 1 tabla 5). Se realizó caracterización macroscópica (figura 12) y microscópica las cuales se mantuvieron intactas a la conservada, el microorganismo creció por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

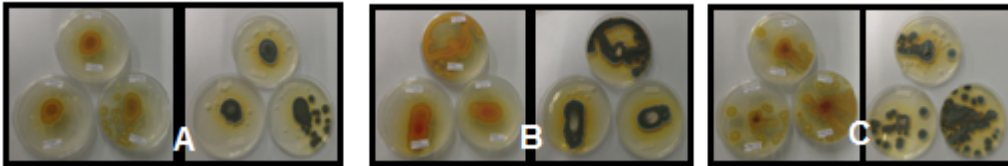


Figura 12. Conservación cepa 62 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.6 Cepa 66 *Penicillium* CV 33

En sus características macroscópicas presenta colonias con textura algodonosa, centro blanco y periferia azul verdosa (anexo 1 tabla 6). Se aconseja sembrar nuevamente el papel filtro con el fin de corroborar los datos ya que se presume que la contaminación que presento fue ambiental en comparación con la conservación en leche la cual se contaminación fue del inoculo. En la conservación de papel filtro y glicerol se observó el crecimiento del hongo, su morfología permanecía intacta a la conservada. El método que cumplió con los tres criterios fue el glicerol y el papel con dos (estabilidad y viabilidad), como se observa en la figura 13.

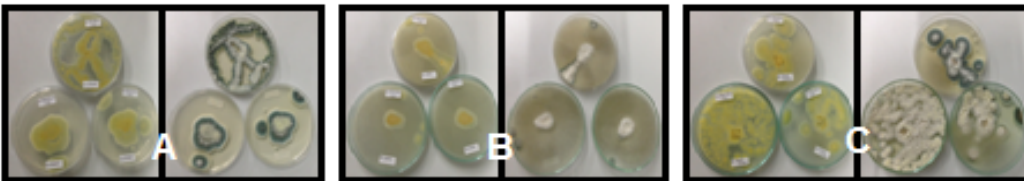


Figura 13. Conservación cepa 66 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.7 Cepa 68 *Penicillium* CV 4

En sus características macroscópicas presenta colonias algodonosas blancas y borde verde oscuro en ocasiones el centro se torna verde (anexo 1 tabla 7). Se realizo características macroscópicas (figura 14) y microscópica las cuales se mantuvieron a la cepa conservada. Por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

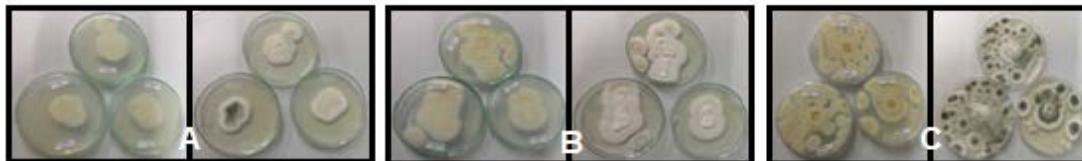


Figura 14. Conservación cepa 68(A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.8 Cepa 73 *Penicillium* 10 CV

Se realizó una caracterización macroscópica (figura 15) observando colonias similares a las conservadas (anexo 1 tabla 8), la microscopía (figura 16) se evidenciaron conidios elipsoidales, fiálide delgadas en forma de pincel, debido a esta microscopía y a las características macroscópicas se siguió la clave taxonómica identificando que podría tratarse del género *Verticillium* sp. para estar más seguros es necesario realizar pruebas moleculares, este género tiene estructuras similares a *Penicillium* sp. por lo cual fue catalogado como este.

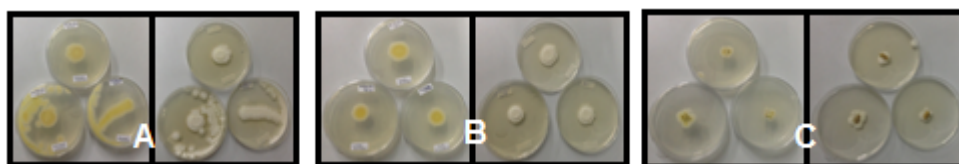
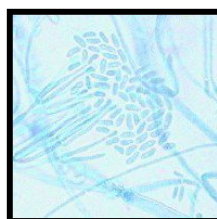


Figura 15. Conservación cepa 73 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)



Figuro 16. Microscopia de la cepa 73

7.6.9 Cepa 74 *Penicillium* PGSL5

Sus características macroscópicas son colonias con textura pulverulenta centro verde oscuro y borde blanco (anexo 1 tabla 9). Existió una correcta conservación de este microorganismo ya que se logró mantener sus características macroscópicas (figura 17) y microscópicas. Por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad

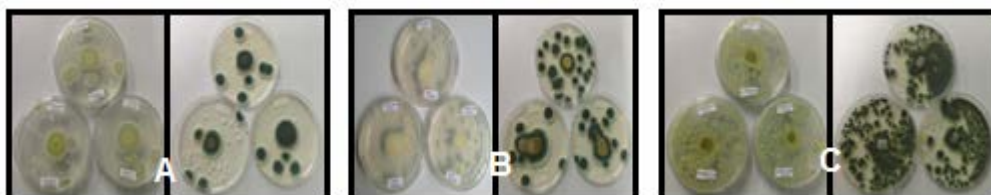


Figura 17. Conservación cepa 74 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.10 Cepa 77 *Penicillium* D 10

Sus características macroscópicas fueron colonias con textura pulverulenta, centro verde oliva que con el tiempo se oscurece y borde blanco (anexo 1 tabla 10). Sus características macroscópicas (Figura 18) y microscópicas fueron iguales a las conservadas. Por lo tanto el método de papel filtro cumplió con los tres parámetros evaluados: estabilidad, viabilidad y pureza. Para los otros dos métodos se requieren realizar nuevamente pruebas y corroborar que se trata de contaminación ambiental.

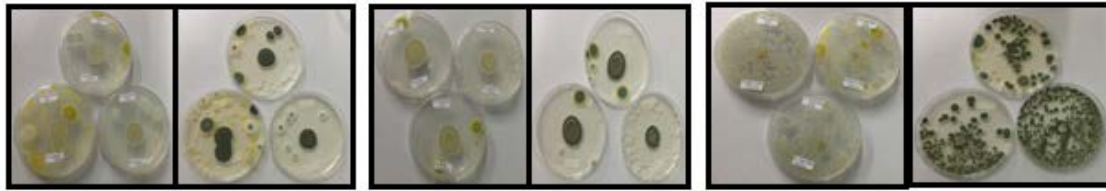


Figura 18.Conservacion cepa 77 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.11 Cepa 81 *Aspergillus A 26*

Sus características macroscópicas fueron colonias pulverulentas centro verde oliva (anexo 1 tabla 11). Se realizó caracterización macroscópica (figura 19) observando colonias iguales a las conservadas, en la caracterización microscópica se observó la misma morfología y el microorganismo creció sin ninguna restricción por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

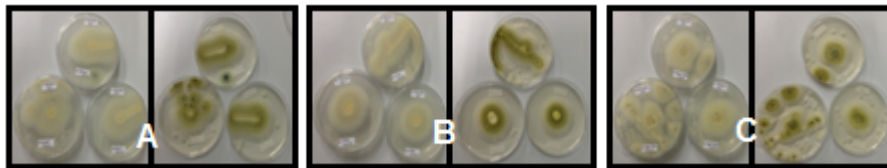


Figura 19.Conservacion en glicerol cepa 81(A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.12 Cepa 83 *Aspergillus EK2.1*

Sus características son colonia amarilla clara con borde claro y textura aterciopelada (anexo 1 tabla 12). Sus características macroscópicas (figura 20) y microscópicas presentaron las mismas características de la cepa conservada. Por lo cual estos métodos cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad.

Según su caracterización, estudios previos y su similitud a la cepa 41 puede tratarse aparentemente de *Aspergillus terreus* para asegurar esto es necesario realizar pruebas moleculares.

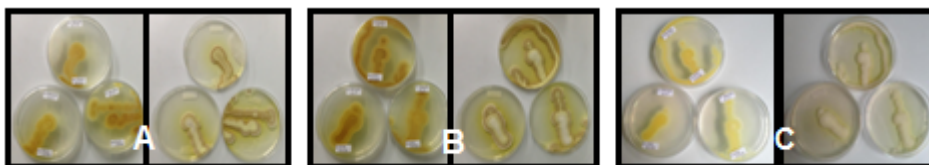


Figura 20. Conservación de la cepa 83 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.13 Cepa 92 *Aspergillus sp. 8*

Este microorganismo presento colonias de textura pulverulenta, centro verde esmeralda además genera pigmentos amarillos difusibles al medio (anexo 1 tabla 13). Se realizó caracterización macroscópica (figura 21) y microscopia las cuales fueron iguales a las conservadas además se evidencio crecimiento por lo cual el glicerol y papel filtro cumplieron con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad (en el caso de la leche se evidencio contaminación por colonias satélites por lo cual se aconseja realizar nuevamente la activación y verificar si es contaminación ambiental).

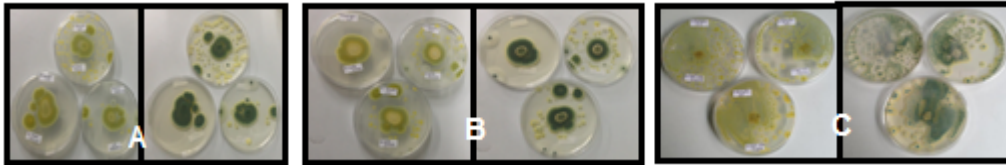


Figura 21. Conservación cepa 92 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.14 Cepa 93 *Aspergillus* sp. 9

En sus características macroscópicas presentó colonias de textura algodonosa, centro verde oscuro y periferia blanca micelial (ver anexo 1 tabla 14). Se realizó caracterización macroscópica (figura 22) y microscopía las cuales fueron iguales a las conservadas, además se evidenció crecimiento por lo cual el glicerol cumplió con los tres criterios evaluados pureza, estabilidad y viabilidad (en el caso de la leche descremada y papel filtro fue contaminación por colonias satélites por se aconseja reactivas nuevamente y verificar que se trate de contaminación ambiental).

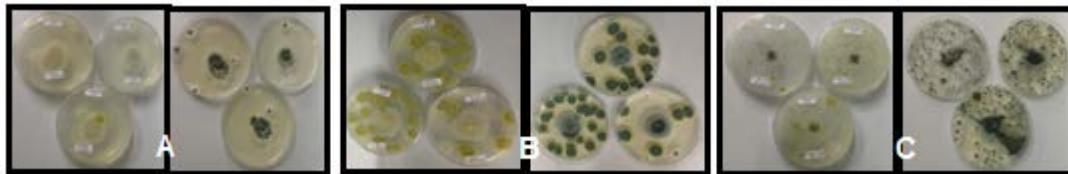


Figura 22. Conservación cepa 93 (A Glicerol, B Leche Descremada, C Papel filtro)

7.6.15 Cepa 102 *Penicillium* sp. 4

La última cepa evaluada es 102 *Penicillium* sp. en sus características macroscópicas presentó colonias algodonosas en el centro azul oscuro y borde blanco (para detalle ver anexo 1 tabla 15). No se logró realizar recuento en glicerol, leche descremada y papel filtro ya que se evidenció contaminación con *Mucor* sp. como sucedió con la cepa 35. La contaminación proviene de la misma suspensión ya que creció donde se inoculó mas no se desarrollaron colonias satelitales, esto pudo deberse a que la suspensión realizada se contaminó con esporas de *Mucor* sp., también pudo ser causada por una mala manipulación con las puntas y la micropipeta, además se ha reportado que es un microorganismo contaminante común del laboratorio lo cual puede ser un factor en contra a este. No existió registro fotográfico debido a que se descartaron las cajas.

Estos resultados indican que las técnicas implementadas cumplen con los tres parámetros evaluados de viabilidad, pureza y estabilidad por esto se logró implementar un POE para cada conservación. Este viene estructurado de la siguiente manera:

- Objetivo de la conservación
- Alcance
- Terminología (para que el lector tenga una introducción a los procesos que realizará).
- Fundamento de la técnica a utilizar
- Condiciones que se requieren para llevar a cabo el proceso
- Materiales que usarán en el trascurso del experimento

- Descripción detallada de los procedimientos favoreciendo el desarrollo de cada una de las técnicas
- Análisis de datos y cálculos que se requieran realizar para la interpretación de resultados.

8 CONCLUSIONES

- Se realizó la comparación de los métodos de conservación de la colección de microorganismos del Laboratorio de Química Microbiológica, identificando que el método de conservación en glicerol permitió la recuperación de ocho cepas , cinco de suelo, dos de papel filtro y ninguna de agua destilada, el glicerol fue la técnica más efectiva porque permitió recuperar el mayor número de aislamientos; a pesar, de que ninguno de los métodos usados cumplían con el fundamento, con los tiempos de conservación, las temperaturas y los parámetros evaluados de estabilidad, viabilidad y pureza.
- Se realizó la conservación de las quince cepas recuperadas en cuatro métodos: Papel filtro, glicerol, leche descremada y liofilización, se ejecuto un prueba al mes de conservadas evaluando viabilidad, estabilidad y pureza, de esta prueba se obtuvieron trece aislamientos que cumplían con los parámetros establecidos y las dos restantes se perdieron por contaminación.
- Se logró implementar un POE para cada método de conservación, aplicable únicamente a hongos filamentosos, donde se explica paso a paso el procedimiento a seguir, favoreciendo el desarrollo de cada una de las técnicas.

9 RECOMENDACIONES

- Continuar recuperando las cepas conservadas en el Laboratorio de Química Microbiológica previamente realizadas, con el fin de no perder parte de la biodiversidad de los páramos de Cruz Verde y Guasca, con un posible potencial biotecnológico.
- Utilizar el POE establecido para cada una de las conservaciones y cumplir con lo estipulado en ellos.
- Hacer recuento en placa para determinar el porcentaje de viabilidad de los periodos de tiempo evaluados según el método de conservación.
- Al reactivar las cepas conservadas, es necesario darle las condiciones adecuadas para su desarrollo, debido a que los hongos vienen de condiciones adversas.
- Evaluar la actividad metabólica y fisiológica de cada una de las cepas conservadas mediante técnicas moleculares.
- De acuerdo al método de conservación utilizado evaluar periodos de tiempo más prolongados que permitan determinar la vigencia de cada uno de los métodos.

- Evaluar largos periodos de tiempo que permitan determinar la efectividad de la técnica utilizada.
- Evaluar la actividad metabólica y fisiológica de cada una de las cepas.

10 BIBLIOGRAFÍA

Ángel D (2006) Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Arenas J, Ballesteros L (2011) Identificación, conservación y elaboración de un banco de Hongos aislados previamente de los páramos Cruz verde y Guasca ubicados en Cundinamarca Colombia. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Burguet N, Sierra N, Brito L (2012) Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en laboratorios. www.revista.cnic.edu.co/revistaCB/articulos. Consultado Junio 30 de 2013

Crahay C, Declerck S, Colpaert J, Pigeon M, Munaut F (2012) Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal biology* 117 :103 -100

Chaparro A (2010) Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Tesis posgrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Csernics A, Gabor N, Iturriaga E, Szekeres A, Eslava A, Csaba V, Papp T (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal genetics and biology* 48: 696-703

García M, Uruburu F (2001) La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT). www.uv.es/cect/. Consultado Marzo 26 2013

Gato Y (2010) Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum rifai*. *Fitosanidad* 14(3):189-195

Henao I, Franco M, Marín G (2006) Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas scientiarum* 11 (2):51 -60

Hubálek Z (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229

Huérfino N (2010) Identificación, caracterización morfológica y conservación de hongos filamentosos aislados previamente de los páramos de Cruz verde y Guasca. Tesis pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Inokuma K, Takano M, Hoshino K (2013) Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical engineering journal* 72: 24-32

Kim J, Yeo S, Baek S, Choi H (2011) Molecular and Morphological Identification of Fungal Species Isolated from Bealmijang Meju. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1270-1279

Morales M, Otero J, Van der Hammen J, Torres A, Cadena C, Pedraza C, Rodríguez N, Franco C, Betancourth J, Olaya E, Posada E, Cárdenas L (2007) Atlas de páramos de Colombia (Ed) Grey Comercializadora Ltda. Bogotá, pp 92-96

Morris G, Smith D, Coulson G (1988) A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Journal of General Microbiology* 134: 2897- 2906

Muhammad Mukhtarb, Zahida Parveenc, David A. Logana (1998) Isolation of RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of Microbiological Methods* 33: 115–118

Mukhtar M, Parveen Z, Logan DA (1998) Isolation of RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides* *Journal of Microbiological Methods* 33: 115-118

Nieves A, Santos C, Betancourt C (1997) Notas sobre los agaricales del páramo de Guasca departamento de Cundinamarca, Colombia. *Caldasia* 19: 349-351

Ocampo A (2011) Obtención de metabolitos secundarios obtenidos en fermentación líquida de una cepa nativa aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Tesis pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Panizo N, Reviakina V, Montes W, Gonzales G (2005) Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología* 25 (1): 35-40

Parra S, Pérez M, Bernal M, Suarez Z , Montoya D (2006) Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas IGENES del instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova publicación científica* 4 (6):39 - 49

Ramos L, Ramadan S, López C, Bulacio L, Mellado S (2006) Empleo de discos de papel secante para la conservación de cepas de *Malassezia* spp. *Revista Iberoamericana de Micología* 23: 110-112

Rodríguez P (2011) Conformación de un banco de hongos filamentosos aislados previamente de los páramos de Guasca y Cruz verde. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Smith D (1993) Tolerance to freezing and thawing. (ed): Tolerance of Fungi. Marcel Dekker, New York pp 145-171

Smith D, Kolkowski J (1996) *Fungi*. Maintaning cultures for biotechnology and industry 6: 101-132

Sánchez J, Echandi M , Armenta , Armenta J, Salas D (2012) Luz ultravioleta germicida y control de microorganismos ambientales en hospitales. *Revista Costarricense de Salud Pública* 21 (1): 1409 -1429

Sosa A, Álvarez V, Borgue G, González M, Ponce E (2011) Evaluación del método de conservación en papel filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* cohn, mediante la actividad antagonica frente a *Rhizoctonia solani*. *kuhn Fitosanidad* 15 (1): 45-49

Tanghe A, Van Dijck P, Thevelein J (2003) Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications. *Advances in Applied Microbiology* 53: 129 -176

Universidad de Valencia (2010) Colección española de cultivos. www.cect.org. Consultado Julio 10 de 2013

Vargas A, Villamizar D (2009) Estudio preliminar de la producción, extracción y purificación de T2 toxina por *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 en dos medios sintéticos. Tesis pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Villena G, Gutiérrez M (2003) Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista peruana de biología* 10 (1): 78-87

Weng Z, Díaz O, Álvarez I (2005) Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer?. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 43 (3): 1-4

11 ANEXOS

Anexo 1

1. Preparación medios de cultivo:

Se seleccionó el medio de cultivo a utilizar (PDA), de acuerdo al número de aislamientos se calculó los gramos necesarios (según la etiqueta del medio), se pesó la cantidad requerida y se adiciono al agua destilada (depende de la cantidad de medio a preparar), se calentó hasta ebullición y se envió a esterilizar a 121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (psi).

2. Preparación Tween 80 al 0,01% (v/v):

Se hizo una dilución al 10 % (v/v), se tomo 10 mL de Tween 80 al 100% (v/v) y se adicionaron a 90 mL de agua destilada, posteriormente se realizo una dilución 1/100 para preparar Tween al 0.1% (v/v), se tomó 1 ml de la solución al 10% (v/v) y se agrego a 99 mL de agua destilada. El Tween al 0.1 % (v/v) se dispuso en tubos tapa rosca 16x150 mm cada uno con un volumen de 10 mL. Esta solución se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (psi).

3. Alistamiento de material para conservación en papel filtro

Se tomó papel Whatman N°3 y se cortaron cuadrados de 1 cm por 1 cm. La cantidad de cuadrados dependió de los hongos a conservar. Se enviaron a esterilizar a 121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (psi).