





Universidad Autónoma de San Luis Potosí

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTANDARIZACION DE METODOS DE  
PRESERVACION PARA HONGOS A MEDIANO  
Y LARGO PLAZO

**Trabajo Recepcional**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
P R E S E N T A:  
ODILA VILLEDA TREJO

ASESOR O. F. B. BLANCA ORTIZ SALDIVAR

San Luis Potosí, S. L. P.

1996







T  
QR41  
V5  
C.1



1080075338



# Universidad Autónoma de San Luis Potosí

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



ESTANDARIZACION DE METODOS DE  
PRESERVACION PARA HONGOS A MEDIANO  
Y LARGO PLAZO

## Trabajo Recepcional

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

ODILA VILLEDA TREJO

ASESOR: Q. F. B. BLANCA ORTIZ SALDIVAR

San Luis Potosi, S. L. P.

1993



T  
RMI  
Q  
VS







**EL PRESENTE TRABAJO SE IMPRIMIO CON APOYO**

**DE LA COMISION NACIONAL DEL AGUA.**

***ESTANDARIZACION DE METODOS DE PRESERVACION  
PARA HONGOS A MEDIANO Y LARGO PLAZO***

***ODILA VILLEDA TREJO***



***ASESOR: Q.F.B. BLANCA ORTIZ SALDIVAR***

Gracias Señor por haberme dado  
la oportunidad de realizar este trabajo  
el cual me permite subir un escalón  
mas en la vida.

Gracias Señor por los obsequios  
hasta este momento, que me dieron  
apoyo, alegrías y satisfacciones:  
mis padres, hermanos, grandes amigos  
compañeros y maestros.

Gracias Señor porque me diste paciencia  
y fortaleza para soportar y eliminar  
momentos en que hubiera deseado  
dejar inconcluso mi estudio.

Gracias Señor por permitirme llegar  
a esta meta que tu me trazaste.  
En la cual cada sacrificio sirvió para  
recompensar el beneficio que recibí.

Y espero que ahora y siempre  
permanezcas a mi lado, conduciendo  
mis pasos, de antemano se que  
nunca me dejarás sola.

Simplemente Gracias.....SEÑOR



## **D E D I C A T O R I A**

***La presente tesis esta dedicada  
a la memoria de mi padre:  
Serafín Villeda Martínez.***

***A mi madre:  
Con mi más grande admiración y  
eterna gratitud  
Rosa Trejo Zamudio.***

***Padres:  
Gracias por el buen ejemplo,  
apoyo, comprensión y trabajo  
me impulsaron a seguir adelante.***

***A mis hermanos:  
Israel  
Araceli  
Lidia  
Imelda***

***A la familia:  
Morales García-Soria***

***A mis Amigos:  
Por todos los momentos compartidos, juntos.***

***Odila Villeda Trejo.***

## AGRADECIMIENTO

*De manera muy especial a la Q.F.B. Blanca Ortíz Saldivar en reconocimiento a la invaluable ayuda brindada para la realización y asesoría de la presente tesis.*

*Al personal de Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias - Químicas de la U.A.S.L.P.*

*A la C.N.A. (Comisión Nacional de Agua) por el apoyo brindado.*



## INDICE

	Pag
<b>I. INTRODUCCION.</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES HISTORICOS.</b>	3
<b>III. GENERALIDADES.</b>	5
<b>3.1. Crecimiento.</b>	6
<b>3.2. Ciclo de crecimiento de Levaduras.</b>	7
<b>3.3. Crecimiento de microorganismos filamentosos.</b>	8
<b>3.4. Determinación de la cantidad y peso de microorganismos.</b>	10
<b>3.5. Cuentas de Viables.</b>	11
<b>3.6. Agentes Crioprotectores.</b>	12
<b>3.7. Métodos de conservación.</b>	13
<b>3.8. Elección del método de mantenimiento.</b>	15
<b>3.9. Recuperación.</b>	16
<b>IV. OBJETIVOS.</b>	17
<i>Sección Experimental</i>	18
<b>V. MATERIAL.</b>	19
<b>VI. MATERIAL BIOLOGICO.</b>	21
<b>VII. METODOLOGIA.</b>	
<b>7.1. Determinación de la curva de crecimiento para levaduras.</b>	22
<b>7.2. Preparación de viales usando como medios de soportes papel, sílice, feldespató y sílica gel.</b>	26
<b>7.3. Preparación de viales utilizando como soporte agua destilada estéril.</b>	26
<b>7.4. Preparación de agua estéril.</b>	26
<b>7.5. Preparación de leche descremada usada como crioprotector.</b>	27
<b>7.6. Preparación de solución salina al 0.85 %.</b>	27
<b>7.7. Método para conservación de levadura.</b>	28
<b>7.8. Método de conservación de hongos filamentosos.</b>	29
<b>7.9. Viabilidad.</b>	32
<i>Fecha de inicio de conservación</i>	33
<b>VIII. RESULTADOS.</b>	34
<b>8.1 Crecimiento para hongos levaduriformes y filamentosos.</b>	35
<b>8.1.1 Curva de crecimiento de hongos levaduriformes.</b>	35
<b>8.1.2 Crecimiento de microorganismos filamentosos.</b>	36
<b>8.2 Resultados del comportamiento de los microorganismos en los diferentes soportes.</b>	37
<b>8.3 Macro y micromorfología de algunas cepas estudiadas en diferentes soportes.</b>	62
<b>IX. CONCLUSIONES Y DISCUSION.</b>	72
<b>X. BIBLIOGRAFIA.</b>	76

## INDICE DE TABLAS

8.1.1.1 <i>Tabla de resultados de la curva de crecimiento de los hongos levaduriformes.</i>	35
8.1.1.2 <i>Tabla del porciento de viabilidad y eficiencia de los soportes respecto a los levaduras utilizadas.</i>	47
8.1.2.1 <i>Tabla de resultados de los hongos filamentosos.</i>	36
8.1.2.2 <i>Tabla del porciento de viabilidad y eficiencia de los soportes respecto a los hongos filamentosos utilizados.</i>	60

## INDICE DE GRAFICAS

<i>Gráfica No. 1. Rhodotorula sp</i>	38
<i>Gráfica No. 2. Saccharomyces cerevisiae</i>	39
<i>Gráfica No. 3. Candida parapsilosis</i>	41
<i>Gráfica No. 4 Candida guilliermondii</i>	42
<i>Gráfica No. 5 Trychophyton mentagrophytes</i>	44
<i>Gráfica No. 6 Cryptococcus albidus var. albidus</i>	45
<i>Gráfica No. 7 Torulopsis candida</i>	46
<i>Gráfica A. Eficencia de los soportes respecto a los hongos levaduriformes utilizados.</i>	48
<i>Gráfica No. 8 Fusarium chysogenum</i>	50
<i>Gráfica No. 9 Trychophyton tonsurans</i>	51
<i>Gráfica No. 10 Microsporum canis</i>	52
<i>Gráfica No. 11 Epidermophyton floccosum</i>	54
<i>Gráfica No. 12 Trychophyton rubrum</i>	55
<i>Gráfica No. 13 Microsporum gypseum</i>	57
<i>Gráfica No. 14 Cryptococcus neoformans</i>	58
<i>Gráfica No. 15 Trychophyton verrucosom</i>	59
<i>Gráfica B. Eficencia de los soportes respecto a los hongos filamentosos utilizados.</i>	61

## INDICE DE FOTOGRAFIAS

<i>Macro y micromorfología de Rhodotorula sp</i>	63
<i>Macro y micromorfología de Saccharomyces cerevisiae</i>	64
<i>Macro y micromorfología de Candida parapsilosis</i>	65
<i>Macro y micromorfología de Trychophyton mentagrophytes</i>	66
<i>Macro y micromorfología de Trychophyton tonsurans</i>	67
<i>Macro y micromorfología de Microsporum canis</i>	68
<i>Macro y micromorfología de Epidermophyton floccosum</i>	69
<i>Macro y micromorfología de Microsporum gypseum</i>	70
<i>Macro morfología de Trychophyton rubrum</i>	71

## **I. INTRODUCCION**

*Todos los microbiólogos necesitan preservar los microorganismos que manejan, con la finalidad de poder estudiarlos y al conocer su comportamiento, estimular su reproducción si se trata de microorganismos que le sean útiles al hombre, o bien controlarlos y erradicarlos, si son microorganismos patógenos que causen enfermedades a plantas, animales o al hombre mismo.*

*La necesidad de preservación se aplica a las universidades que manejan carreras del área biológica, puesto que el contar con los diversos microorganismos garantiza el hecho de que el alumnado de las diversas carreras relacionadas con la biología aprendan a conocerlos, clasificarlos y dominarlos. Además, en la rama industrial son un sinnúmero de microorganismos los que intervienen en igual número de procesos ya sea como fermentadores, para obtener medicamentos, en la fabricación de alimentos diversos, además de intervenir en innumerables procesos biosintéticos, por lo que es igualmente de importante su conservación.*

*Los taxónomos deben mantener gran número de cepas para estudios comparativos. Los laboratorios de investigación requieren de cultivos puros para múltiples propósitos.*

*La función principal de un cepario es la de actuar como depósito para todo tipo de microorganismos de importancia pasada, presente o potencial.*

*La función básica de las colecciones de microorganismos es entonces el almacenamiento y provisión de los cultivos. Un cultivo antes de formar parte de una colección debe garantizar su pureza y autenticidad.*

*Las colonias de microorganismos son extremadamente vulnerables, es decir, están expuestas a contaminarse sufrir cambios o desaparecer, a menos de que se cuente con técnicas de conservación que prevengan estos sucesos.*

*Los cultivos puros que son afectados por alguno de estos factores generalmente son irre recuperables, y su pérdida puede ser de graves consecuencias; otras veces pueden ser reaislados, sin embargo en ambos casos se pierde tiempo, información y dinero.*

*Esto puede ser evitado mediante un sistema efectivo de mantenimiento de colonias. ( 5 )*

*Un cepario tiene total compromiso para la preservación de colonias y actualmente en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.S.L.P. se experimenta con diversas técnicas de preservación.*

*Se debe hacer énfasis en que no existe un método Universal para la preservación exitosa de todos los microorganismos.*

*En el presente trabajo se experimentó con diversos métodos de preservación y se muestran detalles con respecto a la sobrevivencia de los microorganismos conservados. ( 5 )*



## II. ANTECEDENTES HISTORICOS

*En la historia de la microbiología no existen datos exactos sobre la información de las primeras colecciones de cultivos microbianos. Se sabe que en 1980 Franz Král, en Praga, formó una de las primeras colecciones integradas por algunos cientos de cultivos de bacterias, levaduras y hongos filamentosos; esta colección pasó posteriormente a la Universidad de Viena y al morir, Král, Ernst Pribram de la Universidad de Loyola en Chicago consiguió llevarse la mitad de la colección, quedando el resto en la Universidad de Viena. Después de cinco años de trabajo, publicó en 1919 lo que se considera como el primer catálogo microbiano, aunque se sabe que Franz Král en 1919 ya había dejado un escrito.*

*Cuando Pribram muere, algunos cultivos son transferidos a lo que ahora es The American Type Culture Collection y el resto permaneció en Loyola. Se tiene noticia de que las colecciones Japonesa y Suiza datan de 1876, que se originaron como colecciones privadas, y que mas tarde se incorporaron a otras instituciones como la Universidad de Cambridge en Inglaterra y el Northern Regional Research Laboratory en Peoria, Illinois, EUA.*

*Al inicio del presente siglo se dio importancia mundial a la formación de colecciones microbianas. El 1914 la Asociación Internacional de Botánica fundó en Holanda el Central Albuerae Vart Schimmelcultures. En 1920, en Londres, el Instituto Lister estableció The National of Type Cultures. The American Type Culture Collection de los EUA se origina en 1911 en el Museo de Historia Natural de Nueva York y se terminó de organizar en 1925.*

*Después se sucedieron las colecciones del Instituto Pasteur, de la Universidad de París en Francia, la del Instituto Robert Koch y la de la Universidad de Gottingen en Alemania, las cuales aún están en plena actividad.*

*En México, Jeanat Stern, botánico de formación, desarrolló en 1939 el primer laboratorio de microbiología industrial en la escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y organizó una colección de cepas con los principales microorganismos que producen fermentaciones y que intervienen en la producción de sustancias útiles en la industria. La colección se inició con aproximadamente 50 cepas de bacterias y hongos filamentosos que fueron utilizados para la enseñanza. Durante varias décadas no se presentó ningún avance sustancial en este campo en México. (1)*

*A fines de 1972 se planeó la formación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, y con ello se pensó en la creación de una colección de cultivos microbianos a fin de contar con un acervo de cultivos puros utilizables en las actividades de docencia e investigación del Departamento. (6)*



*Actualmente existen mas de 500 colecciones de microorganismos distribuidas en 58 países, registradas en la Federación Internacional de Colecciones Microbianas (WFCC por sus siglas en inglés). Cada colección cubre un amplio espectro de microorganismos, virus, líneas celulares, vectores, etc. La WFCC es una organización internacional interesada en establecer centros de abastecimiento de cultivos microbianos y difundir el trabajo realizado en las colecciones a través de todo el mundo. Juega un papel primordial en la organización de las actividades de las colecciones de microorganismos y tiene entre sus miembros expertos en las diferentes áreas de la microbiología.*

*La WFCC financia y es el responsable del Centro Mundial de Datos de Colecciones de Microorganismos (Word Data Center, WDC). Este centro es pionero en la formación de un banco de datos con la información completa de los estirpes que cada colección mantiene, así como las actividades y servicios que presta.*

*El WDC sirve de enlace entre las colecciones, otros bancos de datos y las Federaciones Mundiales, Nacionales y Regionales. Algunos de los servicios que presta son la localización de colecciones, proyectos de investigación, microorganismos que se conservan, características específicas, disponibilidad y costos. (6)*

### **III. GENERALIDADES**

*La microbiología es una de las ciencias que tiene mucho que ofrecer a los países en desarrollo por su trascendencia en la salud pública, en la medicina, en la agricultura y en la industria. Las colecciones de microorganismos constituyen el epicentro de la investigación en esta área del conocimiento puesto que las exigencias de la disciplina son cada vez más estrictas en el empleo de cultivos de procedencia conocida que ofrezcan una pureza y conservación garantizadas.*

*El cambio de estructura, morfología y actividad metabólica de ciertos microorganismos puede ser acelerada por el ambiente artificial de un laboratorio modificando sus características para ser utilizados en nuevos procesos, mejorando su rendimiento.*

*Sin embargo esta tendencia puede ser inconveniente en cepas seleccionadas para garantizar la conservación eficiente de un proceso biológico.*

*El término "Conservación" se refiere a la acción de dar a una población, en este caso microbiana la capacidad de retener su pureza, viabilidad y características morfológicas y fisiológicas de generación en generación. La protección de la configuración genética de una cepa es muy difícil y posee serios problemas ya que la progenie de cualquier célula está sujeta a cambios genéticos eventuales causados por el medio, o por la pérdida o intercambio de material genético durante el crecimiento y la reproducción.*

*El alto costo que está involucrado en la selección de cepas usadas en la investigación, desarrollo, aplicación de patentes y promoción de productos, significa la inversión de un capital considerable. Además la factibilidad económica de algunas industrias biotecnológicas suele ser superior a la de los procesos tradicionales. Todo esto resalta cada vez mas la importancia de conservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible un acervo de cultivos microbianos auténticamente puros que se encuentran disponibles sobre demanda y pueden constituir un factor decisivo en la generación de procesos biotecnológicos, o bien estén disponibles para ser usados en procesos de investigación o enseñanza. Estas son entre otras más las funciones que debe cumplir una colección de cultivos microbianos. (6)*

*No existen métodos de conservación óptimos para todos los grupos microbianos. Sin embargo se logran técnicas eficientes cuando se toman en cuenta las siguientes consideraciones:*

*A) Mantener por períodos relativamente largos un alto porcentaje de viabilidad y sin alteraciones de las velocidades de crecimiento.*

*B) Conservar la composición genética de la progenie del cultivo original. (6)*

*La elección de métodos de conservación depende de muchos factores, por ejemplo los requerimientos de una colección de enseñanza, difiere de las colecciones taxonómicas que requieren métodos que estabilicen la morfología y fisiología del organismo; las colecciones industriales requieren de técnicas de conservación que garanticen la estabilidad genética. (5)*

*Según las necesidades y características de los microorganismos existen programas de conservación a corto, mediano y largo plazo de acuerdo a su duración:*

*A) Métodos a corto plazo. Dentro de ellos se encuentran las resiembras periódicas, botellitas de colección con medio de BHI y cistina.*

*B) Métodos a mediano plazo. Dentro de ellos se encuentran aceite mineral, discos de gelatina, agua estéril y discos de papel.*

*C) Métodos a largo plazo. Se encuentran sílica gel, tierra estéril, sílice, feldespato, nitrógeno líquido y liofilización. (2)*

### **3.1 CRECIMIENTO**

*La palabra "Crecimiento" de uso común, no es un término preciso, pues se dice que un objeto, un organismo o una población crecen cuando aumentan de tamaño.*

*El crecimiento de un sistema biológico se puede definir como el aumento en masa o tamaño, acompañado de la síntesis de macromoléculas, encaminados a la producción de una nueva estructura organizada. El crecimiento normalmente provoca la multiplicación microbiana, en un organismo multicelular la multiplicación celular conduce a un aumento en tamaño del individuo y en un organismo unicelular a un aumento de la cantidad de individuos.*

*El desarrollo de los microorganismos, es esencialmente, la síntesis balanceada específica de los componentes del protoplasma a partir de las sustancias nutritivas que se encuentran en el ambiente inmediato. Los constituyentes así sintetizados se deben ensamblar y acomodar adecuadamente para formar réplicas de la unidad original.*



*La germinación de una espora de hongo es un ejemplo. Su metabolismo endógeno de síntesis o anabolismo está a bajo nivel, pero si se pasa a un medio favorable empezará a germinar, lo cual se manifiesta por la dilatación de la espora y luego sigue la salida de uno o más tubos germinales que van a formar el micelio en tanto haya nutrientes; si no hay algún factor limitante aumenta el tamaño y la masa, y la síntesis de macromoléculas da como resultado la producción de una nueva estructura organizada.*

*En el caso de las levaduras (Hongo unicelulares) el crecimiento es lineal y no exponencial como en las bacterias, y al reproducirse forman yemas; los componentes originales del organismo progenitor permanecen en él, y los constituyentes recién sintetizados se encuentran en la progenie. En el lugar donde se forma la yema o blastospora se forma una escara o cicatriz, lugar en el que la levadura no puede volver a gemar por lo que después que ha generado entre veinte y veinticinco nuevos organismos la levadura envejece.*

*Las hifas de los hongos filamentosos crecen en una zona justa detrás de la punta de la hifa, por lo que el crecimiento de los hongos es apical. Se sabe que los hongos filamentosos también envejecen, pues como sólo crecen en la punta de los filamentos, las regiones que están detrás de esas puntas envejecen progresivamente.*

### **3.2 CICLO DESARROLLO DE LEVADURAS**

*Cuando se siembran microorganismos en un medio nutritivo y se incuban a una temperatura apropiada sucede una secuencia característica de cambios. Después de un período latente y variable, los organismos aumentan en masa y luego se dividen; a medida que prosigue el crecimiento, fase de crecimiento lineal o apical, toman los nutrientes del medio y excretan productos finales del metabolismo. Luego el proceso del desarrollo provoca que el ambiente cambie, modificándose tanto que no permite ya el desarrollo, por lo que este llega a detenerse estableciéndose la fase estacionaria. En un cultivo en donde no se reponen sustancias nutritivas el crecimiento continúa sólo durante unas cuantas generaciones y luego empieza a declinar como consecuencia de la acumulación de productos metabólicos tóxicos, o la aproximación al agotamiento del nutriente; el resultado es primero, la inhibición del desarrollo y luego la muerte de los microorganismos, entrando el cultivo a la fase estacionaria máxima. Es la actividad del microorganismo mismo la que provoca los cambios en el medio que conducen a la fase estacionaria.*

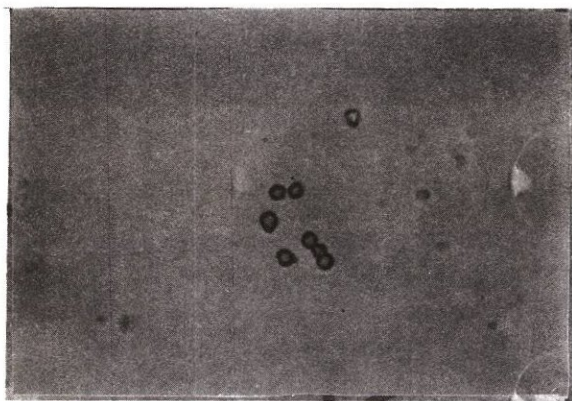
*En la fase de mortalidad disminuye la cantidad de organismos viables, la cuenta total también deja de aumentar cuando termina la multiplicación y la magnitud de la biomasa permanece constante o tiene un ligero declive durante esta fase.*

### **3.3 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS**

*Cuando se siembra un hongo en una placa de gelosa con frecuencia se pueden observar tres fases en su proliferación:*

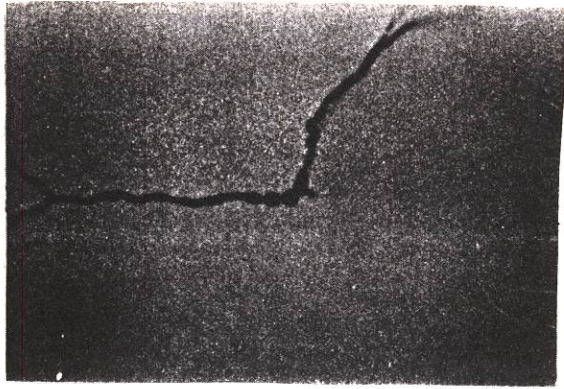
*La fase latente durante la cual germinan las esporas o bien, la regeneración de las hifas dañadas cuando se siembra micelio; la fase exponencial en la cual el diámetro de la colonia aumenta linealmente con el tiempo hasta llegar cerca del borde de la placa y por último la fase de envejecimiento, cuando un hongo se va extendiendo hasta la orilla externa del medio. El momento elegido para la conservación de los hongos filamentosos es cuando estos empiezan a esporular justo antes de que entren en la fase de envejecimiento (Fotos 1, 2, 3 y 4).*

1



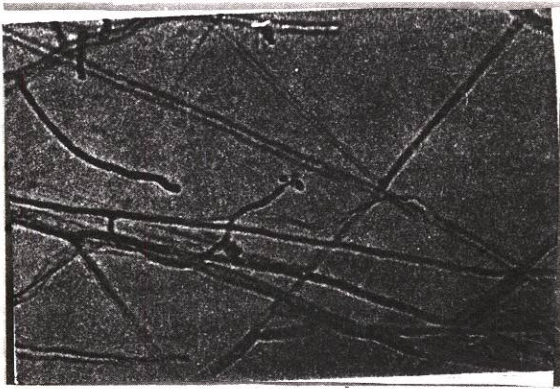
Esporas sin Germinar





Esporas en Germinación

3



Formación de Micelio

4



Esporulación en forma de Macroconidias

### **3.4 DETERMINACION DE LA CANTIDAD Y PESO DE MICROORGANISMOS**

*Para conocer el curso del desarrollo microbiano es necesario hacer mediciones cuantitativas, lo cual se puede efectuar determinando dos diferentes parámetros:*

- 1.- La masa o densidad, que es el peso de los organismos por unidad de volumen.*
- 2.- El número de organismos individuales o concentración, que es el número de organismos también por unidad de volumen.*

*Estas mediciones pueden comprender tanto microorganismos vivos y muertos como vivos solamente y se expresan como cuentas totales o de viables respectivamente.*

**CUENTA TOTAL.** *Para este recuento se emplean varios procedimientos, tales como los siguientes:*

- 1.- Cuenta directa en el microscopio.*
- 2.- Cuenta directa mediante el contador electrónico Coulter que va contando cada organismo que pasa por una abertura diminuta con lo cual altera la conductividad electrónica.*
- 3.- Cuenta directa en frotos secos, teñidos, de volúmenes conocidos de organismos esparcidos en un área conocida.*
- 4.- Medición de la turbiedad de la suspensión espectrofotométrica-mente con un turbidímetro (Mide la cantidad residual de luz, después del paso de un haz de luz de intensidad conocida a través de la suspensión microbiana).*
- 5.- Separación de los organismos mediante filtración o centrifugación y pesado.*
- 6.- Análisis de elementos como nitrógeno, que es proporcional a la cantidad de proteína del organismo o de otros compuestos como ácidos formados en la fermentación de azúcares.*
- 7.- Determinación de la cantidad de precursor radioactivo incorporado en la materia microbiana, como la incorporación de un aminoácido en proteínas.*

**3.5 CUENTA DE VIABLES.** *Estos procedimientos permiten conocer la cantidad de organismos capaces de multiplicarse para formar colonias en medios sólidos o cultivos en ciertos medios en condiciones específicas.*

*Los procedimientos que pueden seguirse para hacer el recuento de viables son:*

*1.- Siembra de diluciones apropiadas de la suspensión microbiana sobre la superficie de las placas de medio o bien, incorporación de la suspensión al medio licuado para verterlo en la caja de petri, incubación y cuenta de las colonias.*

*2.- Dilución gradual de la suspensión de modo que pueda esperarse que en la serie el 50% de los volúmenes apropiados de muestra no contengan organismos viables.*

*Desde el punto de vista de los estudios bioquímicos el crecimiento de microorganismos unicelulares acostumbra a definirse en términos de masa de material celular, mientras que en estudios genéticos o infectivos se habla más de número de células. Ambos conceptos son proporcionales en condiciones de crecimiento continuo.*

### 3.6 AGENTES CRIOPROTECTORES

La adición de agentes crioprotectores nos sirve para mantener estable un microorganismo preservado a baja temperatura, ya que evita la formación de sales y los ayuda a resistir cambios bruscos de temperatura.

Los agentes crioprotectores pueden ser considerados en dos grupos:

1.- Los que penetran en la célula por ejemplo: glicerol, dimetilsulfóxido.

2.- Los que generalmente permanecen en la parte extracelular por ejemplo: sacarosa, sorbitol, lactosa, manitol, poliglicol y polivinil-pirrolidón.

Los agentes que penetran en la célula se usan generalmente a altas concentraciones mientras no tenga un efecto significativo sobre la célula.

Lovelock en su estudio de crioprotección de los globulos rojos con glicerol al 10%, postuló, que las funciones del glicerol son de preveer el incremento excesivo de sales.

Los solutos tales como los azúcares y el polivinil-pirrolidón no pueden penetrar en la célula, esto se debe a que sus propiedades crioprotectoras no son primordialmente coligativas, por ello solo tienen influencia exclusivamente en la membrana de la célula. (9)

Los agentes crioprotectores son de:

a). *Materias proteicas. Albumina, gelatina, peptona, suero de sangre.*

b). *Carbohidratos y polímeros de carbohidratos.- Sacarosa, glicerol, dextrana, etc.*

c) *Aminoácidos. Leche descremada.*

d) *DMSO. Dimetilsulfóxido.*

Los agentes crioprotectores deben ser:

- *Sustancias inertes para no ser asimilables.*

- *No tóxicas.*

- *Que disminuyan la concentración de sales.*

- *Hidrofilicos.*

- *Sustancias que faciliten la sublimación.(7)*





### 3.7 METODOS DE CONSERVACION.

1.- **RESIEMBRAS.** Este es el método tradicional y de más fácil manejo usado para conservación de cepas, por medio de pase periódico en un medio fresco; los intervalos entre cada resiembra varían según la especie, el medio empleado y las condiciones del medio ambiente. Los hongos son subcultivados y almacenados en refrigeración a una temperatura entre 4 a 7° C.

2.- **ALMACENAMIENTO EN ACEITE MINERAL.** Muchas especies se conservan satisfactoriamente por meses o años sumergiéndolos en aceite mineral estéril.

Se hace crecer la cepa en tubos con medio sólido de ASD, en pico de flauta y se agrega asépticamente el aceite mineral cubriendo por completo el área inclinada. Los tubos se guardan en posición vertical en refrigeración a una temperatura entre 1 y 4° C. (5)

3.- **PAPEL.** Es un método en donde las levaduras y las esporas de los hongos son colocados en discos o tiras de papel filtro estéril y llevados a desecación y congelación. Es una técnica fácil y barata que puede aplicarse para mantener los cultivos. (4)

4.- **BLOQUES DE AGAR EN AGUA.** Este método de almacenamiento ha sido usado para mantenimiento de muchos hongos; hongos patógenos de humanos, de plantas y de animales han sobrevivido usando esta técnica. Existen reportes de cepas que han sobrevivido dos años sin pérdida de viabilidad.

5.- **ARENA (FELDESPATO Y SILICE).** El género *Fusarium* famoso por su inestabilidad de cultivos, se ha mantenido en condiciones estables en tierra. Las especies ceptorias han sido mantenidas por este métodos sin pérdida de esporulación ó patogenicidad.

Este técnica ha sido usado con éxito durante 20 años para almacenar 774 cepas de *Fusarium* y otros géneros. (5)

6.- **SILICA GEL.** Muchos hongos han sido almacenados exitosamente por esta técnica. Ha probado ser buena técnica para cultivos en condiciones estables ya que muchos tipos de importancia genética han sido preservados sin cambios. La patogenicidad de los microorganismos se ha mantenido por años.

El almacenamiento de 426 microorganismos aislados fué examinado y los resultados fueron que a los 11 años habían sobrevivido 308 microorganismos (72 %).

Los periodos limitantes de sobrevivencia aún no son conocidos porque el almacenamiento continúa.

**7.- MANTENIMIENTO POR SECAMIENTO.** El cese del metabolismo celular es un pre-requisito para la preservación y almacenamiento a largo plazo de un cultivo microbiano en un estado relativamente libre de acumulación de variantes morfológicas y fisiológicas. Hunt, Gouievich and Lien (1958) y Perkins (1962) descubrieron métodos para preservar los cultivos microbianos por deshidratación con sílica gel anhidrido. Estos métodos son recomendados por su extrema sencillez y aparente seguridad.

Los métodos que han probado ser más eficientes son aquellos que reducen el metabolismo a una extensión que induce a un estado latente artificial. Esto se consigue usualmente por medio de la liofilización o nitrógeno líquido.

**8.- LIOFILIZACION.** Permite la deshidratación de los hongos a un nivel que detiene su metabolismo. La deshidratación se alcanza mediante la sublimación de hielo y se continúa hasta obtener un residuo de humedad entre 1 y 2 %.

Los microorganismos liofilizados pueden almacenarse por tiempos prolongados y se mantienen en condiciones que eviten su contacto con oxígeno, humedad y luz. (2)

**9.- NITROGENO LIQUIDO.** Utilizan nitrógeno líquido para conseguir temperaturas muy bajas siendo satisfactoria para gran número de células vivas por ejemplo: hongos, algas, protozoarios, bacterias y células de mamíferos. (2)



### **3.8 ELECCION DEL METODO DE MANTENIMIENTO**

*Existe una amplia variedad de técnicas para la preservación de microorganismos el método elegido depende de las necesidades particulares de cada usuario.*

*Todos los métodos tienen ventajas y desventajas propias y únicas. La elección del método para uso particular debe determinarse relacionando los rasgos distintivos de cada método.*

*Los rasgos distintivos a considerarse son:*

*A) Mantenimiento de viabilidad. La muerte de las células puede ocurrir durante el proceso de preservación y puede haber más pérdidas durante su almacenamiento dando como resultado niveles bajos e inaceptables de viabilidad. Para evitar la pérdida y el cultivo debe de estar sujeto a un proceso de crecimiento.*

*El método utilizado debe minimizar la pérdida de viabilidad durante el proceso y el almacenamiento, para que una vez preservados los cultivos sobrevivan largos períodos.*

*B) Cambio de la población a través de la selección. Una proporción de células en una población pueden morir durante el proceso inicial de preservación, esto puede ser de poca importancia si se utilizan concentraciones altas de células.*

*El método de preservación debe por lo tanto retener el mayor número de células deseables para que la población sobreviviente sea semejante a la original tanto como sea posible.*

*C) Cambio genético. Los microorganismos que son preservados porque tienen importancia científica o industrial, no deben de perder ninguno de sus caracteres genéticos, ni tampoco obtener otros a través de mutaciones ya que modificarían los productos finales de los procesos.*

*D) Pureza. Los cultivos conservados deben permanecer puros, y el método de preservación debe de minimizar la posibilidad de contaminación.*

*E) Costo. El costo de mantenimiento de cultivos incluyen los gastos de personal, materiales y equipos y facilidades tales como espacio de almacén y suministro de energía. (5)*

*F) Valor de los cultivos. Las consecuencias de la pérdida de un cultivo deben de ser consideradas al elegir el método de preservación, el método debe asegurar al máximo el riesgo de pérdida; para completa seguridad debe utilizarse más de un método.*

G) *Frecuencia del uso del cultivo. Algunos cultivos como las cepas empleadas en la producción industrial de ciertos productos; las requeridas para control o empleadas como material didáctico son recuperadas frecuentemente en el laboratorio. En este caso el riesgo de contaminación debe ser considerado. (2)*

### 3.9 RECUPERACION

*Los cultivos son fácilmente recuperados ya que sólo se necesita tomar una pequeña porción de los soportes que contienen los microorganismos para obtener un cultivo activo. El método es aplicable a una amplia gama de microorganismos, sin embargo la contaminación es el mayor problema y el riesgo que existe con cada uno de los soportes es que lleguen a mezclarse con cualquier contaminante y este puede llegar a matar al cultivo original. La contaminación puede ser reducida si se trabaja asépticamente.*

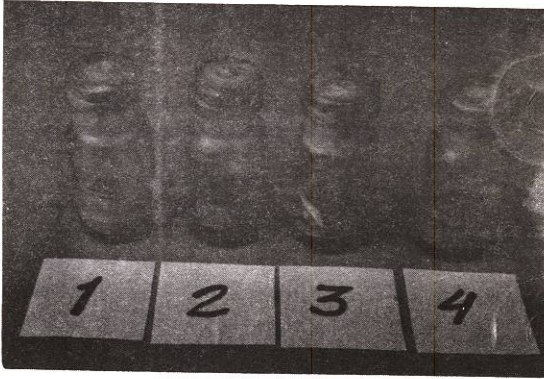
*Es conveniente que cada técnica se realice por duplicado, donde un cultivo se guarda como provisión y el otro como un cultivo de trabajo, por lo tanto se reduce el riesgo de contaminación por la manipulación frecuente. Los periodos de almacenaje pueden extenderse reduciendo la proporción metabólica de los microorganismos. Esto puede ser logrado restringiendo la posibilidad de aire al cultivo. La actividad metabólica puede ser reducida bajando la temperatura y almacenando a 4° C. Sin embargo no todos los microorganismos sobreviven a bajas temperaturas.*

#### **IV. OBJETIVOS**

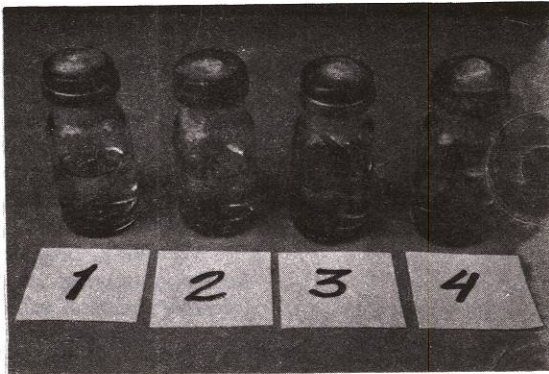
- a).- Estandarizar técnicas de conservación de cepas a mediano y largo plazo con la finalidad de crear un cepario de hongos levaduriformes y filamentosos de interés médico, que nos permita disponer de ellos en el momento que se requiera para llevar a cabo las prácticas de laboratorio de los alumnos del quinto semestre de la carrera Q.F.B. Al mismo tiempo prestar servicios a otros laboratorios de nuestra facultad o instituciones que los soliciten.**
- b).- Mantener a los microorganismos por largo tiempo en las condiciones mas cercanas a las que presentan cuando son aislados de las muestras clínicas.**
- c).- Aislar cepas microbianas a partir de muestras clínicas u otros especímenes que las contengan u obtenerlas a partir de aislamientos primarios hasta obtener una cepa pura.**
- d).- Llevar a cabo las determinaciones morfológicas y fisiológicas de cada cepa aislada para determinar el género y la especie.**
- e).- Llevar a cabo los procedimientos de conservación posible para cada cepa y realizar una evaluación de los mismos.**
- f).- Probar la funcionalidad de otros soportes no reportados en la literatura que sean de facil manejo y bajo costo.( feldespató y sílice).**

## **SECCION EXPERIMENTAL**

**SE ESTUDIO LA UTILIDAD DE LOS SIGUIENTES SOPORTES.**



- 1. Feldespato**
- 2. Papel**
- 3. Sílica gel**
- 4. Sílice**



- 1. Agua con antibiótico en refrigeración**
- 2. Agua con antibiótico sin refrigeración**
- 3. Agua sin antibiótico en refrigeración**
- 4. Agua sin antibiótico sin refrigeración/**

## MATERIAL Y REACTIVOS

### 1. MATERIAL :

*Matraz Erlenmeyer con tapón de algodón.*

*Tubos de ensaye con tapón de algodón.*

*Tubos centrífuga estériles.*

*Caja de petri de 50/10 cm.*

*Cajas para microcultivo.*

*Pipetas de 10.ml.*

*Pipetas de 5 ml.*

*Pipetas de 2 ml.*

*Pipetas de 1 ml.*

*Pipetas de 0.1 ml.*

*Varillas de vidrio.*

*viales.*

*Porta objetos.*

*Cubre objetos.*

*Asa de platino.*

*Pinzas.*

*Gradilla.*

*Tapones de hule estéril*

*Papel parafilm.*

### 2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS :

*Agar Sabouraud.*

*Agar Micobiotic.*

*Caldo Sabouraud.*

*Extracto de malta*

*Leche descremada al 10 %.*

*Solución salina al 0.85 %.*

*Azul algodón lactoferol.*

*Agua destilada estéril.*

*Cloramfenicol.*

*Glicerol.*

*Alcohol.*

*Hielo.*



### **3. APARATOS :**

*Baño metabólico.  
Espectronic 2000.  
Balanza granataria.  
Microscopio.  
Refrigerador.  
Estufa.  
Autoclave.  
Desecador.  
Centrífuga.  
Horno.  
Mechero.*

### **4. MATERIAL PARA CONSERVACION USADO COMO SOPORTE.**

*Sílica gel con indicador.  
Sílica gel sin indicador.  
Discos de papel filtro.  
Agua destilada estéril con cloramfenicol.  
Agua destilada estéril.  
Feldespató.  
Sílice.*



**VI. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.**

1. *Rhodotorula sp.*
2. *Saccharomyces cerevisiae.*
3. *Candida parapsilosis.*
4. *Candida guilliemondii.*
5. *Trychophyton mentagrophytes.*
6. *Cryptococcus albidus var. albidus.*
7. *Torulopsis candida.*
8. *Fusarium chisogenum.*
9. *Trychophyton tonsurans.*
10. *Microsporum canis.*
11. *Epidermophyton floccosum.*
12. *Trychophyton rubrum.*
13. *Microsporum gypseum.*
14. *Cryptococcus neoformans.*
15. *Trychophyton verrucosum.*

## VII. METODOLOGIA

### DETERMINACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA LEVADURAS SIMULTANEA POR TURBIDIMETRIA Y CUENTA DE VIABLES

#### MATERIAL.

- 2 Matracas Erlenmeyer con 200 ml de ASD líquido.
- 1 Tubo de ensaye con 10 ml de ASD líquido.
- 60 Cajas petri con ASD sólido.
- 70 Tubos de ensaye con 4.5 ml de solución salina al 0.85 % . 1 Baño metabólico calibrado a 28° C.
- 10 Varillas de vidrio estériles.
- 10 Pipetas de 10 ml.
- 10 Pipetas de 1 ml.
- 10 Pipetas de 0.1 ml.

#### PROCEDIMIENTO:

1. Se trabajo con cepas que fueron aisladas e identificadas en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U:A:S:L:P:.(11)
2. De la cepa obtenida tomar una asada e inocular en 10 ml de caldo ASD .
3. Incubar a una temperatura adecuada para el crecimiento del microorganismo problema (28°C), durante un tiempo de 18 a 24 hrs.
4. A partir de esta suspensión preparar en solución salina al 0.85 % diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000; de ésta última dilución tomar 3.3 ml e inocular en 200 ml de caldo ASD, contenidos en el matraz Erlenmeyer.
5. De este matraz hacer una dilución 1:10. Tomar 0.05 ml e inocular en una caja de petri con ASD sólido, sembrar por duplicado e incubar a una temperatura de 28°C hasta observación de desarrollo, para realizar la cuenta de viables.
6. Para la determinación turbidimétrica, tomar 5 ml del matraz blanco (caldo ASD ) y depositarlo en una celdilla estéril para calibrar el espectro utilizando una longitud de onda de 610 nm.
7. Tomar 5 ml del matraz problema depositarlo en una celdilla estéril y leer la absorbancia al tiempo "o".
8. Colocar el matraz blanco y problema en el baño metabólico con agitación constante a una temperatura de 28°C durante 12 hrs. (El tiempo es variable para cada microorganismo).
9. Efectuar las lecturas correspondientes al tiempo 1 (12 hrs.).

*10. Del matraz problema, hacer diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000.*

*Tomar 0.05 ml y sembrar en cajas de petri con ASD sólido. Sembrar por duplicado, iniciando por la máxima dilución de la misma forma. Estriar de manera homogénea y por extensión del microorganismo e incubarlas en una estufa a 28° C hasta observación de desarrollo.*

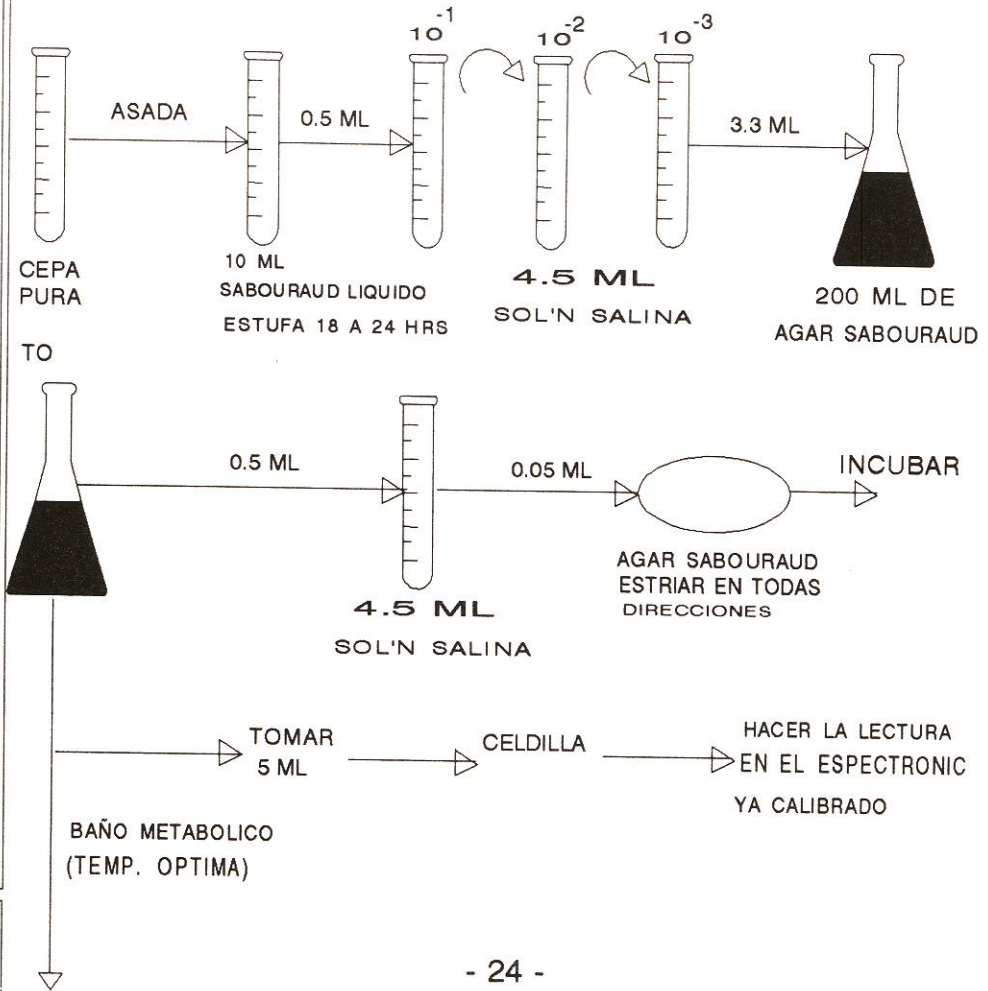
*11. Repetir el mismo procedimiento tanto para leer turbidez como para cuenta de colonias viables. En ésta última aumentar las diluciones y sembrar sólo las 3 últimas e incubar a 28° C para los tiempo 2(24 hrs.), 3(36 hrs.), 4(48hrs.) ... etc. (El tiempo es variable para cada microorganismo.)LL*

*NOTA: El matraz problema como blanco deben permanecer siempre en el baño metabólico. En cada paso tomar la muestra y volver a colocarlos dentro del baño.*

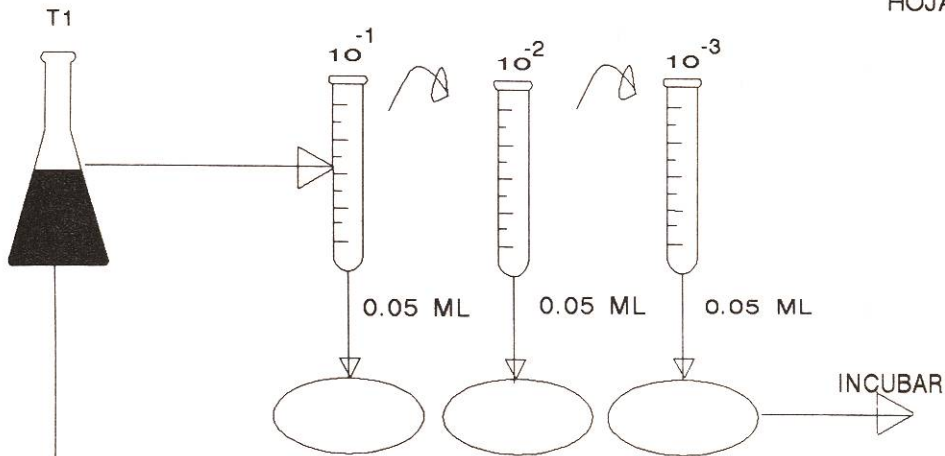
*La masa celular se determinó por medio de su turbidez, por la rapidez de medida en un espectrofotómetro permite que se siga la densidad del cultivo a medida que este crece. La mayor parte de la turbidez es debido a la dispersión de la luz, que depende del elevado índice de refracción de los microorganismos .*

*La determinación del número de células viables se realizó por dilución y por extensión del microorganismo sobre una placa de agar.*

# METODOLOGIA PARA LA CURVA DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS EN FORMA ESQUEMATICA

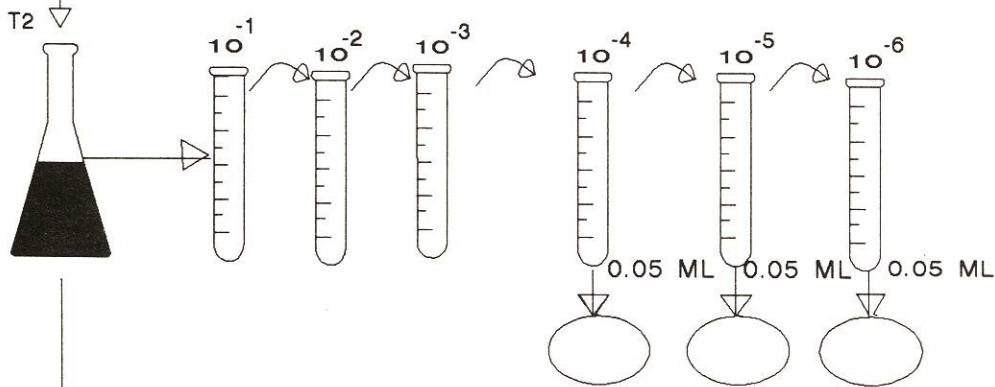






SE SIEMBRA Y SE ESTRIA EN ESTE ORDEN  
O

TOMAR 5 ML → CELDILLA → ESPECTRONIC 2000 CALIBRADO  
BAÑO METABOLICO (TEMP. OPTIMA)



SE SIEMBRA Y SE ESTRIA EN ESTE SENTIDO  
(SE TOMAN NADA MAS LAS 3 ULTIMAS DILUCIONES)

TOMAR 5 ML → CELDILLA → ESPECTRONIC 2000 A 610 NM.

**PREPARACION DE VIALES USANDO COMO MEDIO DE SOPORTE FELDESPATO, SILICE, PAPEL O SILICA GEL, PARA LA CONSERVACION DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS.**

1. *Llenar los viales hasta un cuarto de su capacidad con cuadros de papel filtro (de un tamaño aproximado de 0.5 cm cuadrados), sílice, feldespato o sílica gel, según sea el medio de soporte elegido. Tapar cada uno de los viales con un tapón de algodón y gasa.*
2. *Esterilizar los viales en el horno a 180° C durante una y dos horas, y sus correspondientes tapones de hule esterilizarlos en autoclave a una presión de 15 Lb durante 15 minutos.*
3. *Colocar los viales estériles en un desecador para evitar la absorción de humedad.*

**NOTA:** *Si llegan a presentar hidratación debe ser reesterilizado antes de ser utilizado.*

**PREPARACION DE VIALES USANDO COMO MEDIO DE SOPORTE AGUA DESTILADA.**

1. *Los viales se esterilizan en el horno a 160 grados centígrados durante 30 minutos.*
2. *Llenar los viales hasta 3/4 partes de su capacidad con agua destilada estéril.*
3. *Añadir a la mitad de los viales a utilizar 0.005 g/dl de cloramfenicol.*

**PREPARACION DE AGUA ESTERIL PARA LA SUSPENSION DE ESPORAS.**

1. *Colocar agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Tapar con un tapón de algodón y gasa.*
2. *Meter al autoclave a una temperatura de 121° C durante 15 minutos.*
3. *Enfriar y colocar en refrigeración.*

**PREPARACION DE LECHE DESCREMADA USADA COMO CRIOPRO-TECTOR EN LA CONSERVACION DE CEPAS.**

- 1. Preparar una solución de leche descremada al 10 % en agua destilada, colocándola en un matraz Erlenmeyer con tapón de gasa.**
- 2. Esterilizar la solución en autoclave a 115° C durante 10 minutos.**
- 3. Enfriar y almacenar en refrigeración a 4° C.**

**NOTA: Antes de ser usada debe encontrarse a 4° C..**

**PREPARACION DE SOLUCION SALINA AL 0.85 %**

- 1. Preparar solución salina al 0.85 %.**
- 2. Esterilizar la solución en autoclave a 121° C por 15 minutos.**
- 3. Enfriar y almacenar en refrigeración.**

## **METODOLOGIA PARA CONSERVACION DE HONGOS LEVADURIFORMES**

- 1. Colocar los viales que contienen los diferentes soportes (papel, sílice, feldespato y sílica gel) en una bandeja con hielo durante 15 minutos, antes de ser usados.**
- 2. Homogenizar la suspensión de microorganismos calibrada. ( Ver sección de resultados).**
- 3. Tomar 10 ml. de la suspensión de microorganismos y colocarla en un tubo de centrifuga estéril.**
- 4. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.**
- 5. Decantar el sobrenadante.**
- 6. Resuspender el paquete de levaduras en 5 ml. de la solución salina al 0.85 % estéril.**
- 7. Decantar el sobrenadante.**
- 8. Lavar nuevamente el paquete de levaduras con 5 ml. de solución salina al 0.85 % estéril.**
- 9. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.**
- 10. Decantar el sobrenadante.**
- 11. Resuspender los microorganismos en 2 ml. de leche descremada al 10% estéril.**
- 12. Tomar 1 ml. de la suspensión y colocarla sobre cada uno de los viales preparados; esto se debe hacer en una área estéril.**
- 13. Quitar el tapón de algodón, y cambiarlo por el tapón de hule estéril.**
- 14. Sellar con papel parafilm.**
- 15. Mantener los viales por 30 minutos en hielo.**
- 16. Almacenar en el refrigerador.**

**METODOLOGIA PARA LA CONSERVACION DE HONGOS FILAMENTOSOS  
(PAPEL, SILICE Y FELDESPATO)**

- 1. Aislar, tipificar y purificar la cepa a conservar.**
- 2. Hacerla crecer en cultivo gigante, en caja de petri con ASD para obtener un óptimo crecimiento, según se encuentra en la sección de resultados.**
- 3. Desprender un fragmento de la colonia de la línea de crecimiento fungal.**
- 4. Colocarla en un tubo de ensayo estéril.**
- 5. Agregar 5 ml. de agua estéril.**
- 6. Agitar con una varilla de vidrio, evitando dañar las esporas del hongo.**
- 7. Colocar los viales en baño de hielo, unos 15 minutos antes de ser usados.**
- 8. Tomar 1 ml. de la suspensión de esporas y colocar sobre cada uno de los viales preparados. Evitar la sobresaturación del soporte.**
- 9. Quitar el tapón de algodón y colocar el de hule ya estéril.**
- 10. Sellar con papel parafilm.**
- 11. Colocar los viales por 30 minutos en hielo.**
- 12. Almacenar en refrigerador.**



**METODOLOGIA PARA LA CONSERVACION DE HONGOS  
FILAMENTOSOS EN SILICA GEL**

- 1.- Aislar, tipificar y purificar la cepa a conservar.*
- 2.- Hacerla crecer en cultivo gigante, en caja de petri con ASD para obtener un óptimo crecimiento.*
- 3.- Desprender un fragmento de la colonia de la línea de crecimiento fungal.*
- 4.- Colocarla en un tubo de ensayo estéril.*
- 5.- Agregar 5 ml. de leche descremada al 10%.*
- 6.- Agitar con una varilla de vidrio, evitando dañar las esporas del hongo.*
- 7.- Colocar los viales en baño de hielo, unos 15 minutos antes de ser usados.*
- 8.- Tomar 1 ml. de la suspensión de esporas y colocar sobre cada uno de los viales que contienen sílica gel. Evitar la sobresaturación del soporte.*
- 9.- Quitar el tapón de algodón y colocar el de hule ya estéril.*
- 10.- Sellar con papel parafilm.*
- 11.- Colocar los viales por 30 minutos en hielo.*
- 12.- Almacenar en refrigeración.*

**NOTA:** Almacenar a temperatura ambiente para ver su comportamiento.

**METODOLOGIA PARA LA CONSERVACION DE HONGOS EN AGUA.**

- 1.- Preparar 4 viales con agua destilada estéril, dos de ellos con antibiótico.**
- 2.- De la cepa a conservar, se corta la colonia de la línea de crecimiento fungal de un tamaño aproximadamente de un centímetro cuadrado.**
- 3.- Colocar sobre cada uno de los viales. En condiciones estériles.**
- 4.- Quitar los tapones de algodón, poner los tapones de hule, y sellar con papel parafilm.**
- 5.- Tomar un vial sin antibiótico y otro con antibiótico y almacenar en refrigeración. Los otros dos viales restantes conservar a temperatura ambiente.**

**NOTA: Todo material como pipetas, bisturí, etc, debe ser estéril.**

## **VIABILIDAD**

- 1.- La viabilidad de cada microorganismo se comprueba cada mes, esto se hace colocando unos discos de papel, cristales de sílica gel y una porción pequeña considerable de feldespato o sílice, en un medio adecuado para su crecimiento.(ASD para hongos filamentosos, y extracto de malta para hongos levaduriformes)*
- 2.- Se debe trabajar en un área estéril, y no introducir fragmentos de agar a los viales para evitar que éstos sean contaminados.*
- 3.- Se sellan y mantienen en refrigeración los viales.*
- 4.- Las cajas de petri con medio de cultivo que contienen los soportes con los diferentes microorganismos se colocan en incubación a la temperatura adecuada 28 °C para su crecimiento.*
- 5.- Transcurrido el período de incubación corroborar las características morfológicas de cada cepa, tanto microscópica como macroscópica, así como de sus propiedades fisiológicas cuando sea requerido.*
- 6.- Registrar mensualmente los resultados obtenidos para establecer el tiempo óptimo que proporciona cada uno de los métodos de conservación.*

**FECHA A PARTIR DE LAS CUALES SE CONSERVARON LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS.**

<b>MICROORGANISMOS CONSERVADOS</b>	<b>FECHA DE INICIO DE CONSERVACION</b>
1.- <i>Rhodotorula SP.</i>	06-Nov-1992.
2.- <i>Saccharomyces cereviciae</i>	11-Dic-1992.
3.- <i>Candida parapsilosis</i>	18-Feb-1993.
4.- <i>Candida guilliermondii</i>	17-Feb-1993.
5.- <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	25-Feb-1993.
6.- <i>Cryptococcus albidus Var. albidus</i>	19-Mar-1993.
7.- <i>Torulopsis candida</i>	19-Mar-1993.
8.- <i>Fusarium chisogenum</i>	25-Mar-1993.
9.- <i>Trychophyton tonsurans</i>	25-Mar-1993.
10.- <i>Microsporium canis</i>	25-Mar-1993.
11.- <i>Epidermophyton floccosum</i>	25-Mar-1993.
12.- <i>Trychophyton rubrum</i>	26-Mar-1993.
13.- <i>Microsporium gypseum</i>	01-Abr-1993.
14.- <i>Cryptococcus neoformans</i>	02-Abr-1993.
15.- <i>Trychophyton verrucosum</i>	28-Abr-1993.

## **VIII. RESULTADOS**

*Los resultados del comportamiento de los hongos levaduriformes y filamentosos nos indican la viabilidad mostrada en cada uno de los soportes empleados, al recuperarlos mensualmente durante un tiempo determinado y variable para cada uno de los microorganismos trabajados. Este tiempo fué tomado a partir del primer mes de conservación hasta el mes de octubre de 1993.*

*Las pruebas de viabilidad continuarán por tiempo indefinido, y serán efectuadas por el personal que trabaja en el laboratorio de Micología, hasta ir determinando el tiempo exacto en que permanecen viables las esporas de cada uno de los hongos conservados.*

*Criterio utilizado para determinar la viabilidad de cada especie de hongos conservados, de acuerdo al crecimiento obtenido en cultivo macroscópico:*

*100% de viabilidad : Abundante.*

*50% de viabilidad : Regular.*

*25% de viabilidad : Pobre.*

*0% de viabilidad : Nulo.*

*De la gráfica No. 1 a la No. 7 se muestran los resultados para hongos levaduriformes.*

*De la gráfica No. 8 a la No. 15 se muestran los resultados para hongos filamentosos.*



### 8.1.1 CURVA DE CRECIMIENTO

La masa celular se determinó por medio de turbidimetría, ya que la rapidez de medida de la misma en un espectrofotómetro permite que se siga la densidad del cultivo a medida que éste crece. La mayor parte de la turbidez es debida a la dispersión de la luz, que depende del elevado índice de refracción de los microorganismos.

La cuenta de colonias viables se determinó por medio de diluciones y por extensión del microorganismo sobre placas de agar.

El tiempo de crecimiento en el que se conservaron los hongos levaduriformes es en la fase de crecimiento lineal, ya que en ésta fase llega a un valor constante, donde casi todos los microorganismos formados son viables y de tamaño constante. La cuenta de colonias viables nos permite conocer la cantidad de microorganismos capaces de multiplicarse para formar colonias en medios sólidos o líquidos.

El crecimiento óptimo para la conservación de cada cepa se determinó a partir de la curva de crecimiento obtenida de graficar tiempo vs. absorbancia. De éste modo pudo apreciarse las diferentes etapas: Latente, crecimiento lineal, estacionaria y mortalidad.

De acuerdo a los valores de absorbancia obtenida y cuenta de colonias viables se determinó el tiempo de crecimiento óptimo para su conservación. ( tabla 8.1.1.1 )

### RESULTADOS DE HONGOS LEVADURIFORMES

TABLA 8.1.1.1

MICROORGANISMO	ABSORBANCIA	CUENTA DE COLONIAS	TIEMPO EN QUE SE OBSERVO MAXIMO CRECIMIENTO
<i>Rhodotorula sp</i>	1.7	Incontables	96 Hrs.
<i>S. cerevisiae</i>	1.5	Incontables	96 Hrs.
<i>C. parapsilosis</i>	1.8	Incontables	48 Hrs.
<i>C. guilliermondii</i>	1.5	Incontables	60 Hrs.
<i>Cr. albidus var. albidus</i>	1.6	Incontables	60 Hrs.
<i>T. candida</i>	1.6	Incontables	72 Hrs.
<i>Cr. neoformans</i>	1.8	Incontables	60 Hrs.

### 8.1.2 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS.

Para los hongos filamentosos se observan las fases : Latente, exponencial y de envejecimiento.

El momento elegido para conservación de los hongos filamentosos fué cuando han esporulado justo antes de que entren a la fase de envejecimiento.

Por medio de un seguimiento de microcultivos se determinó el tiempo de esporulación para cada especie según se muestra en la siguiente tabla. ( tabla 8.1.2.1 )

#### RESULTADOS DE HONGOS FILAMENTOSOS

TABLA 8.1.2.1

MICROORGANISMOS	ESPORULACION	TIEMPO DE CONSERVACION
<i>T. mentegrophytes</i>	10 Días	11 Días
<i>F. chisogenum</i>	3 Días	4 Días
<i>T. tonsurans</i>	12 Días	13 Días
<i>M. canis</i>	6 Días	7 Días
<i>E. floccosum</i>	13 Días	14 Días
<i>M. gypseum</i>	8 Días	9 Días
<i>T. rubrum</i>	14 Días	15 Días
<i>T. verrucosum</i>	15 Días	16 Días

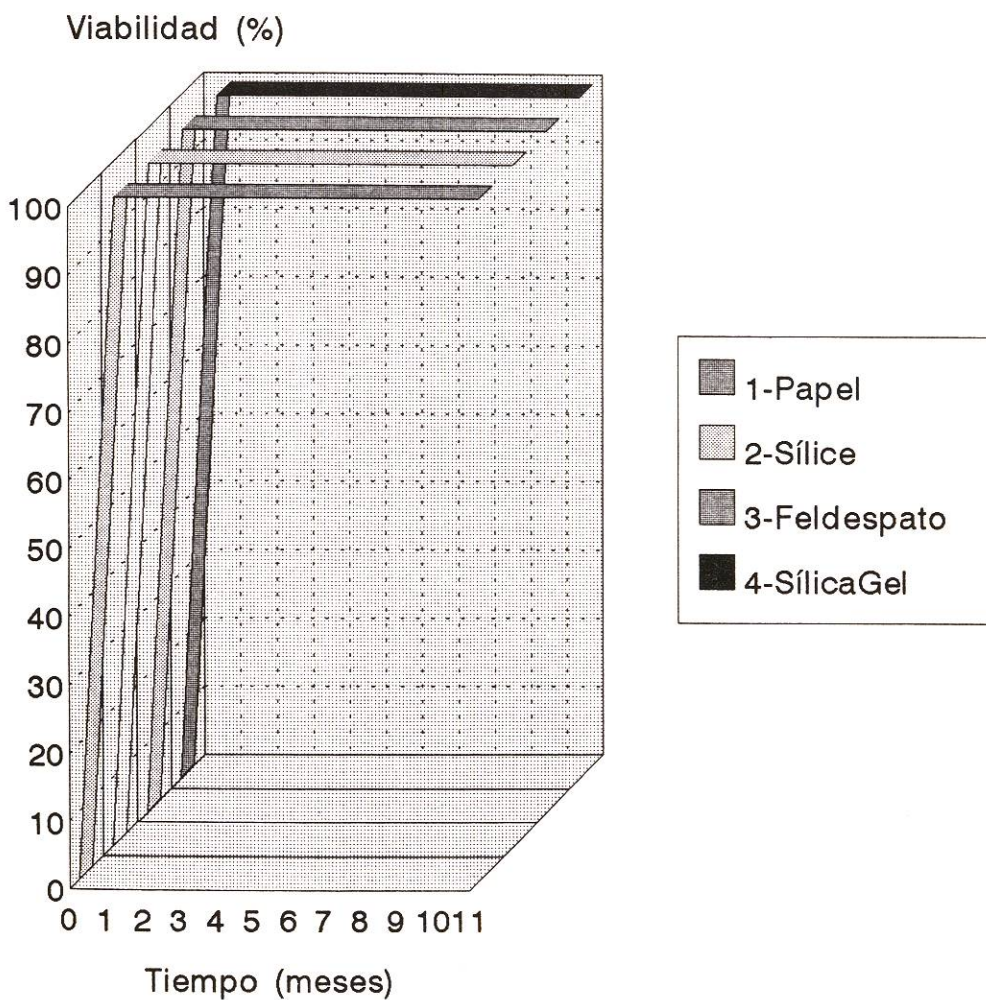
## **8.2 RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS DIFERENTES SOPORTES**

### **8.2.1 HONGOS LEVADURIFORMES**

- *Gráfica No. 1. Nos muestra el comportamiento de Rhodotórula sp. al ser conservado en los diferentes soportes ( papel, sílice, feldespató y sílica gel ) obteniéndose un 100 % de viabilidad al recuperarlo periódicamente durante 11 meses.*

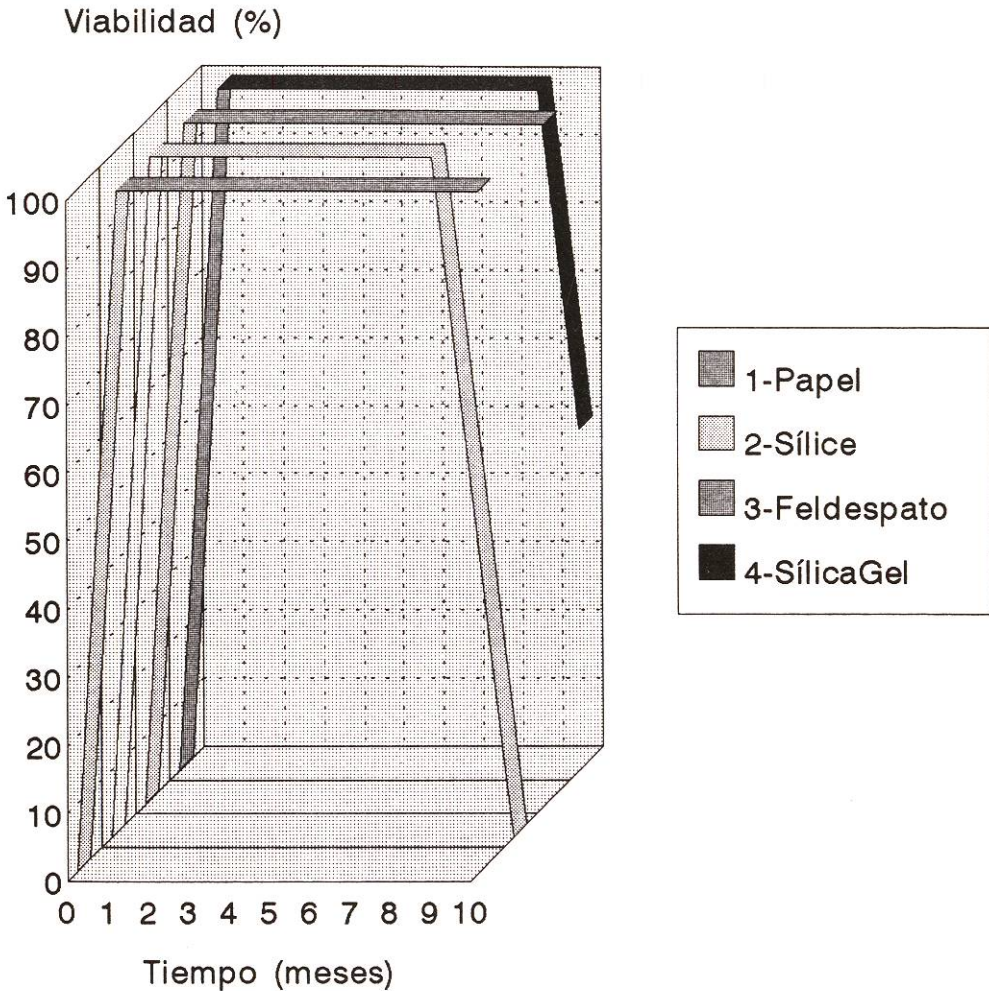
- *Gráfica No. 2. Muestra el comportamiento de Saccharomyces cerevisiae, obteniéndose un 100 % de viabilidad al ser recuperados en papel y feldespató. En sílice hasta el octavo mes se obtuvo una viabilidad al 100 %, en el noveno mes solo hubo una recuperación al 50 % y al décimo mes el crecimiento fué nulo; en sílica gel la viabilidad fué al 100 % hasta el noveno mes y al décimo mes hubo una recuperación de 50 %.*

# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *Rhodotorula sp*





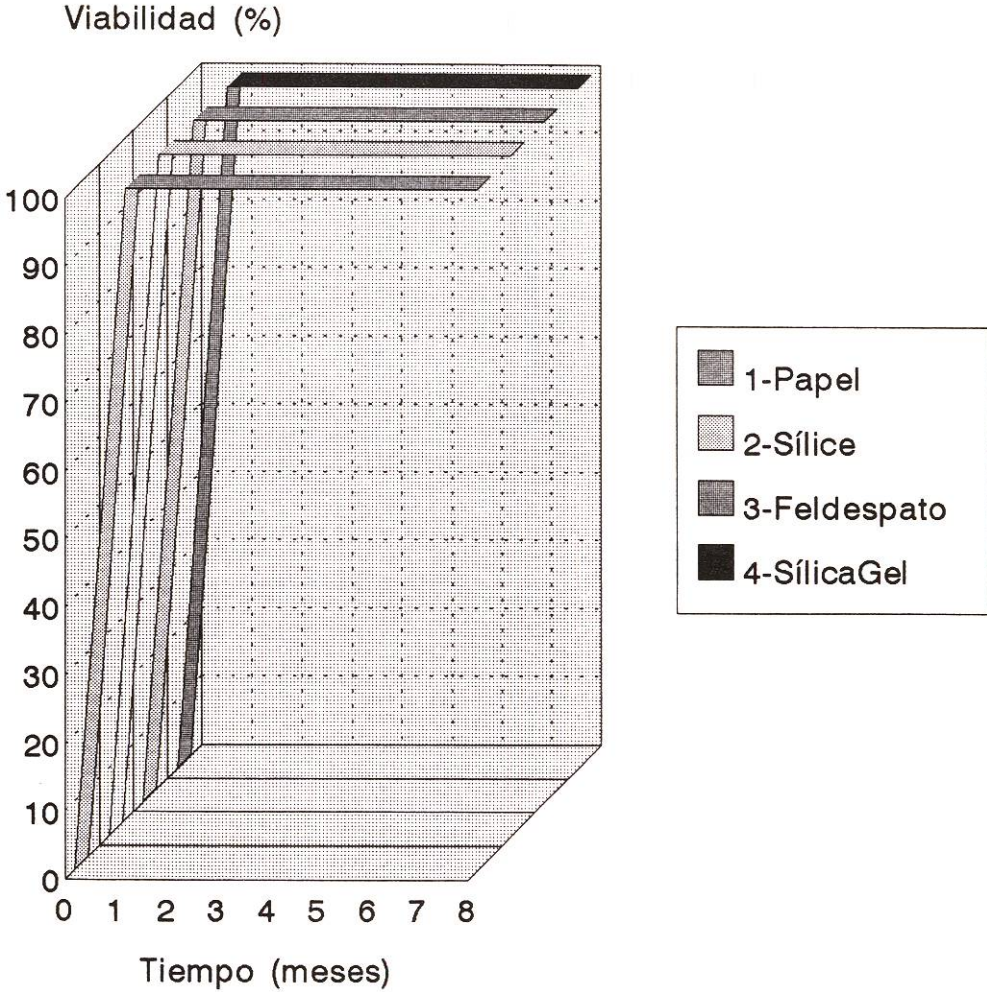
# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *S. cerevisiae*



**- Gráfica No. 3. Muestra el comportamiento de *Candida parapsilosis* al ser conservado en los diferentes soportes nos dá un 100 % de viabilidad en cada uno de ellos en un período de ocho meses.**

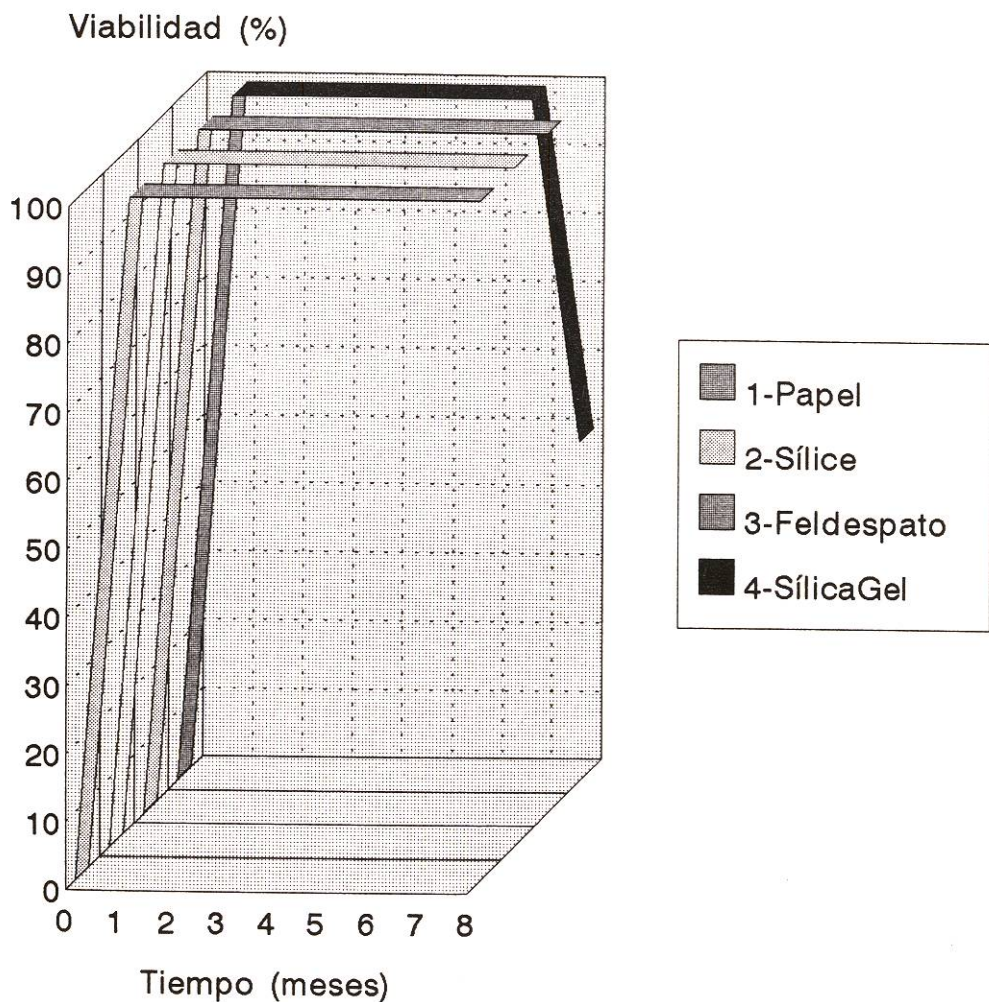
**- Gráfica No. 4. Muestra el comportamiento de *Candida guilliermondii* obteniéndose 100 % de viabilidad al recuperarlos de papel, sílice y feldespato; mientras que en sílica gel al séptimo mes muestra una viabilidad del 100 %, al llegar al octavo mes solo se obtuvo una viabilidad de 50 %.**

# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes C. parapsilosis





# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *C. guilliermondii*



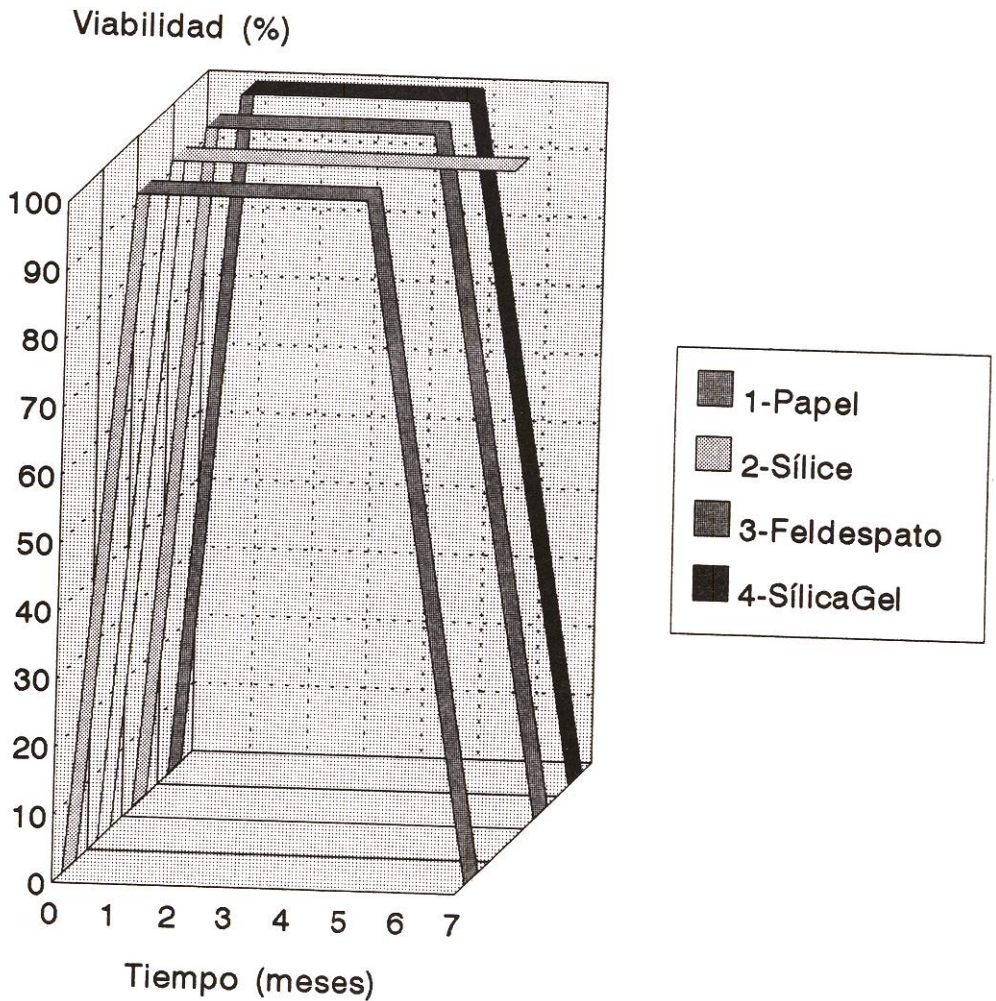
**- Gráfica No. 5. Muestra el comportamiento de *Cryptococcus albidus* var. *albidus* al recuperarlo al séptimo mes en sílice tiene una viabilidad al 100 %; ya que en papel, feldespato y sílica gel solo hasta el sexto mes hubo una recuperación al 100 %, mientras que al séptimo mes el crecimiento fué nulo.**

**- Gráfica No. 6. Muestra el comportamiento de *Torulopsis candida*, observando 100 % de viabilidad al recuperarlos de papel, sílice y feldespato. En sílica gel al sexto mes hay una viabilidad de 100 % y al séptimo mes decae al 50 %.**

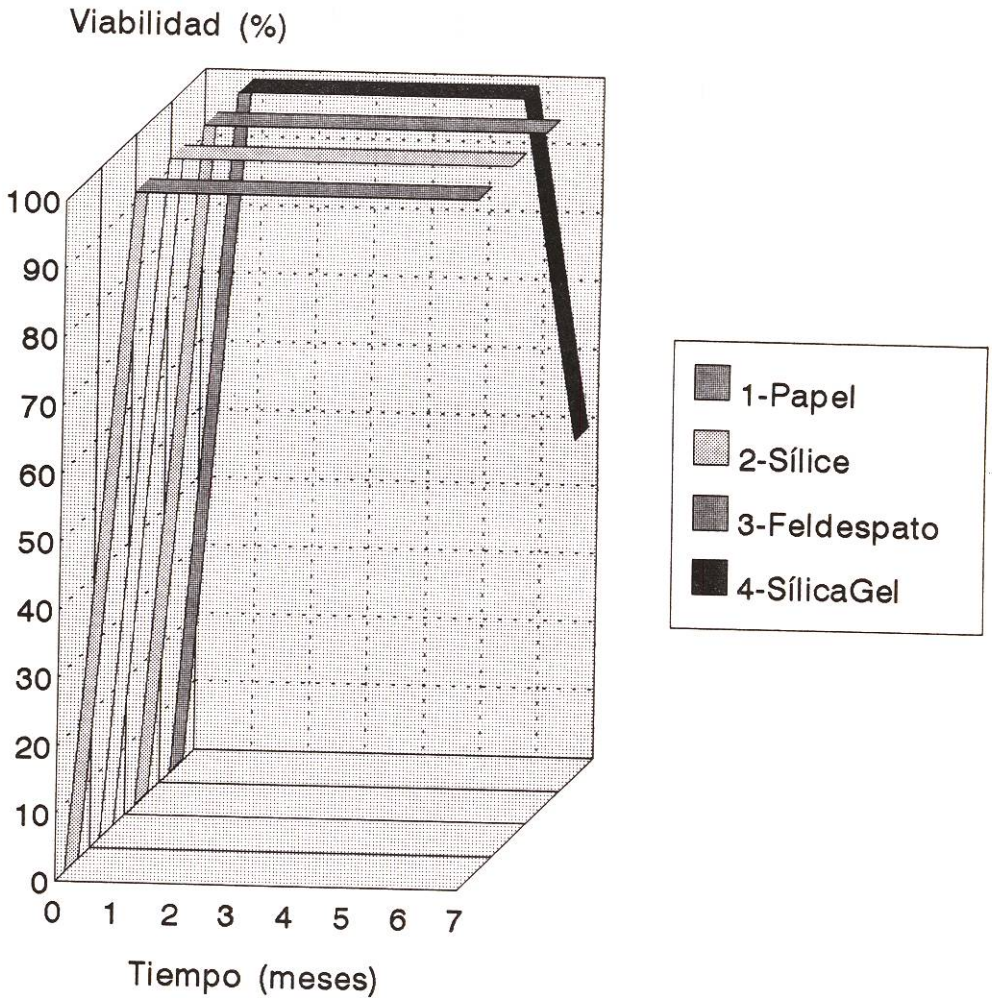
**- Gráfica No. 7. Representa el comportamiento de *Cryptococcus neoformans* al ser recuperado en todos los soportes al 100 % de viabilidad.**



# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *Cr. albidus* var. *albidus*

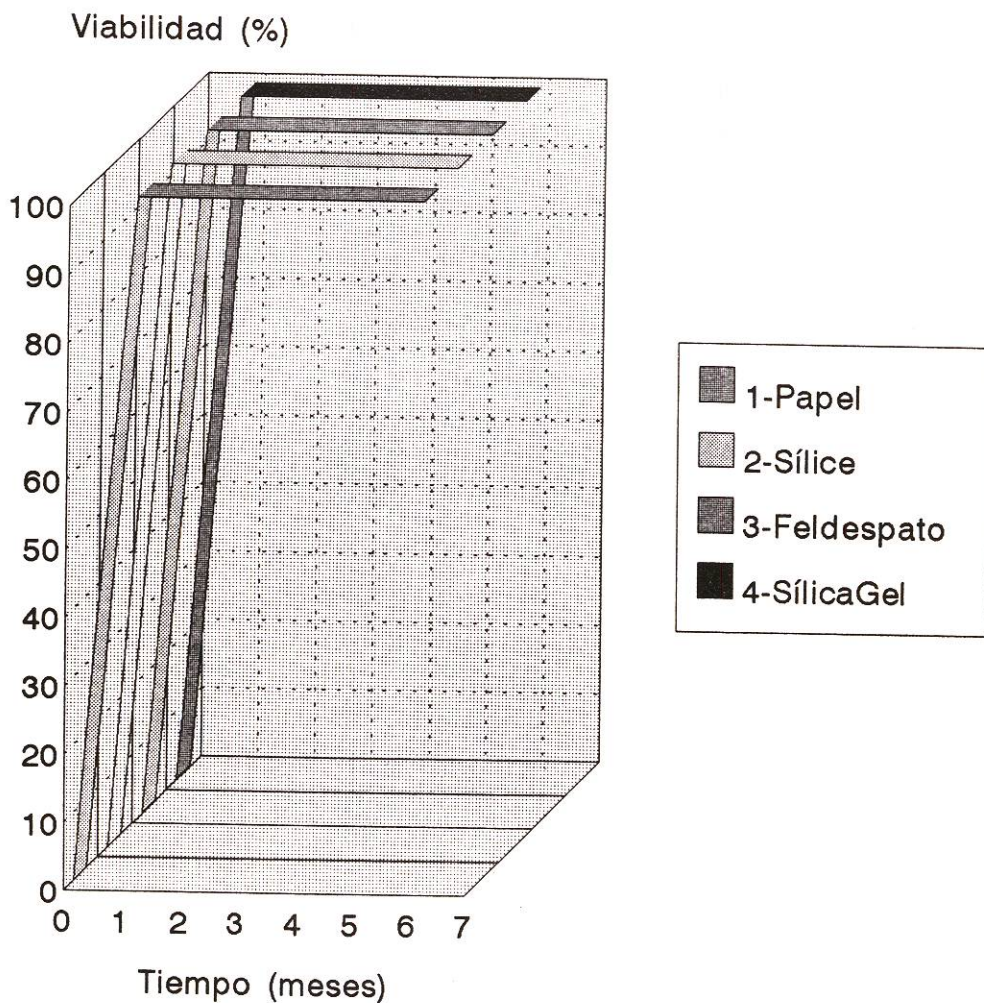


# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes T. candida





# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes Cr. neoformans



**SE DETERMINO TANTO EL PORCIENTO DE VIABILIDAD COMO LA EFICIENCIA DE LA UTILIDAD DE LOS SOPORTES UTILIZADOS.**

**PORCIENTO DE VIABILIDAD Y EFICIENCIA DE LOS SOPORTES RESPECTO A LAS LEVADURAS UTILIZADAS.**

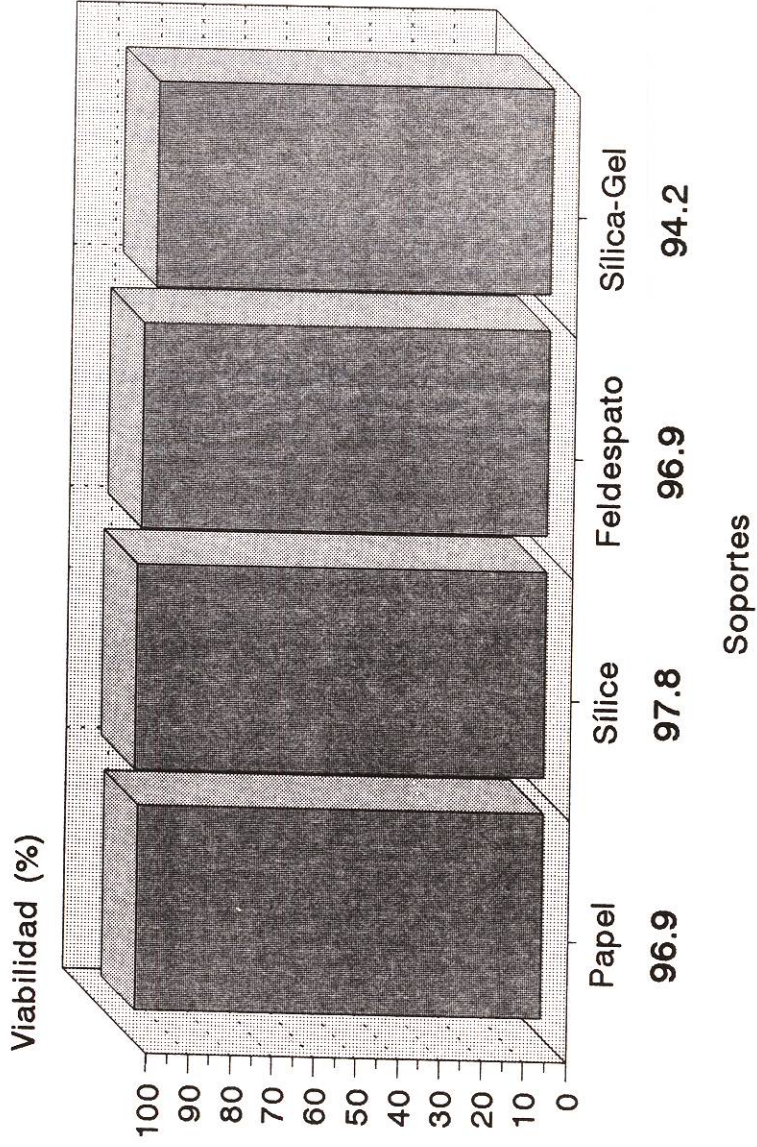
<b>MICROORGANISMO</b>	<b>PAPEL</b>	<b>SILICE</b>	<b>FELDESPATO</b>	<b>SILICA - GEL</b>
<b>1.- RHODOTORULA SP</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>
<b>2.- S. CEREVISIAE</b>	<b>100 %</b>	<b>85 %</b>	<b>100 %</b>	<b>95 %</b>
<b>3.- C. PARAPSILOSIS</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>
<b>4.- C. GUILLIERMONDII</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>93.7 %</b>
<b>5.- CR. ALBIDUS VAR. ALBIDUS</b>	<b>78.5 %</b>	<b>100 %</b>	<b>78.5 %</b>	<b>78.5 %</b>
<b>6.- T. CANDIDA</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>92.8 %</b>
<b>7.- CR. NEOFORMANS</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>
<b>EFICIENCIA</b>	<b>96.9 %</b>	<b>97.8 %</b>	<b>96.9 %</b>	<b>94.2 %</b>

**\* El porcentaje de viabilidad esta dado con base al promedio del tiempo de conservación. ( Partiendo del mes 1 al mes de octubre de 1993 ).**

**\*\* La eficiencia de cada soporte es el promedio del porcentaje de viabilidad de los microorganismos utilizados. ( Consultar la gráfica A ).**



# EFICIENCIA DE LOS SOPORTES RESPECTO A LAS LEVADURAS UTILIZADAS





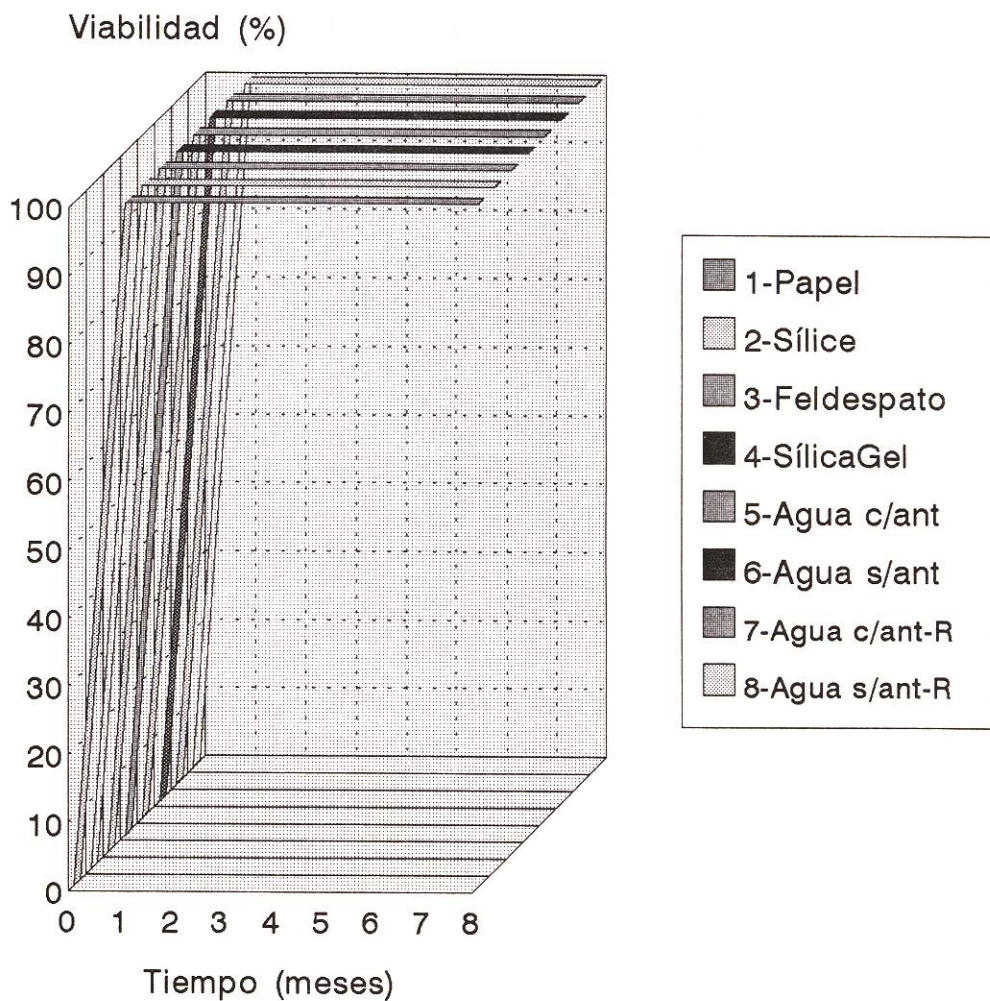
### **8.2.2 HONGOS FILAMENTOSOS.**

**- Gráfica No. 8. Representa el comportamiento de *Trychophyton mentagrophytes* en los diferentes soportes (papel, sílice, feldespató, sílice gel, agua con antibiótico, agua sin antibiótico, agua con antibiótico en refrigeración, agua sin antibiótico en refrigeración) mostrando al octavo mes una viabilidad de 100% en todos los soportes.**

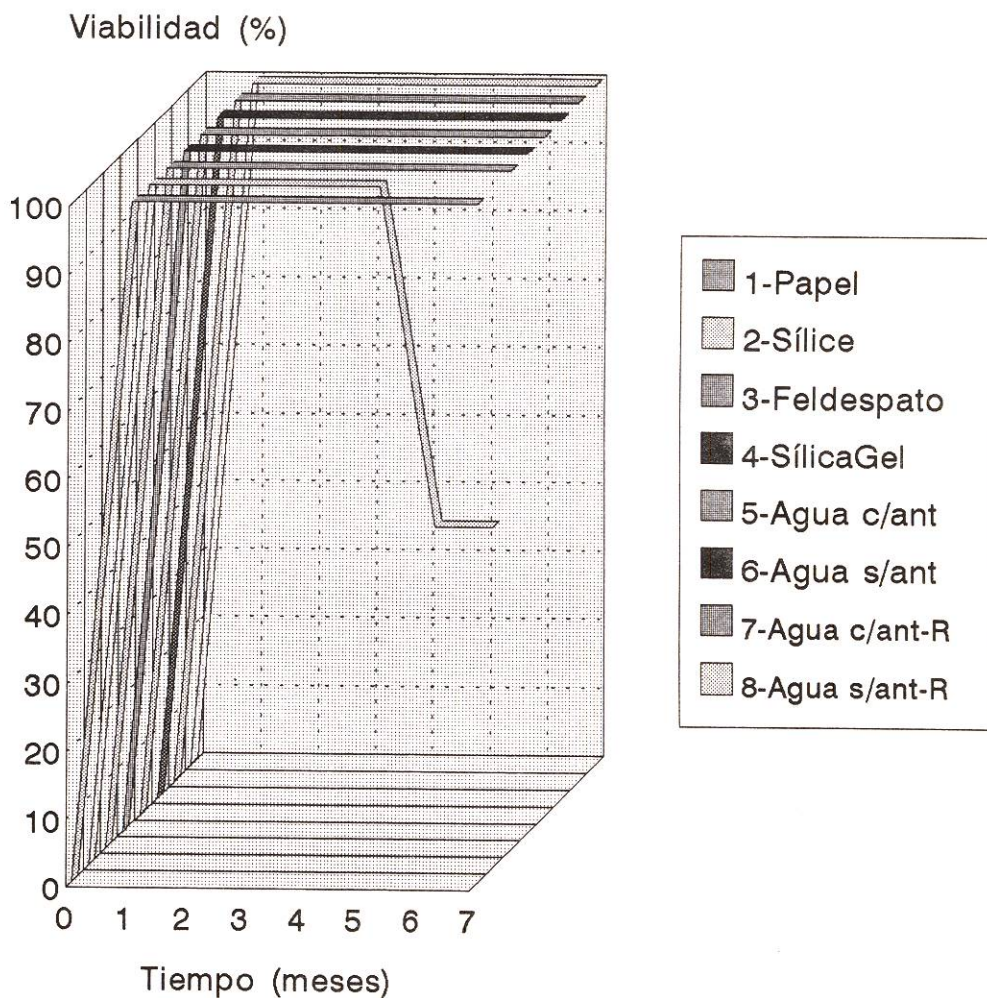
**Gráfica No. 9. Indica el comportamiento de *Fusarium chisogenum*, en los diferentes soportes . En sílice hasta el quinto mes se recuperó al 100%, después del sexto mes se obtuvo una viabilidad al 50%; mientras que en los demás soportes al séptimo mes hubo una recuperación al 100%.**

**Gráfica No. 10. Muestra el comportamiento de *Trychophyton tonsurans*. En papel y sílice gel hasta el quinto mes se obtuvo una viabilidad de 100%, al sexto y séptimo hubo una recuperación de sólo un 50% de viabilidad y en los demás soportes se obtuvo una viabilidad del 100%.**

# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *T. mentagrophytes*

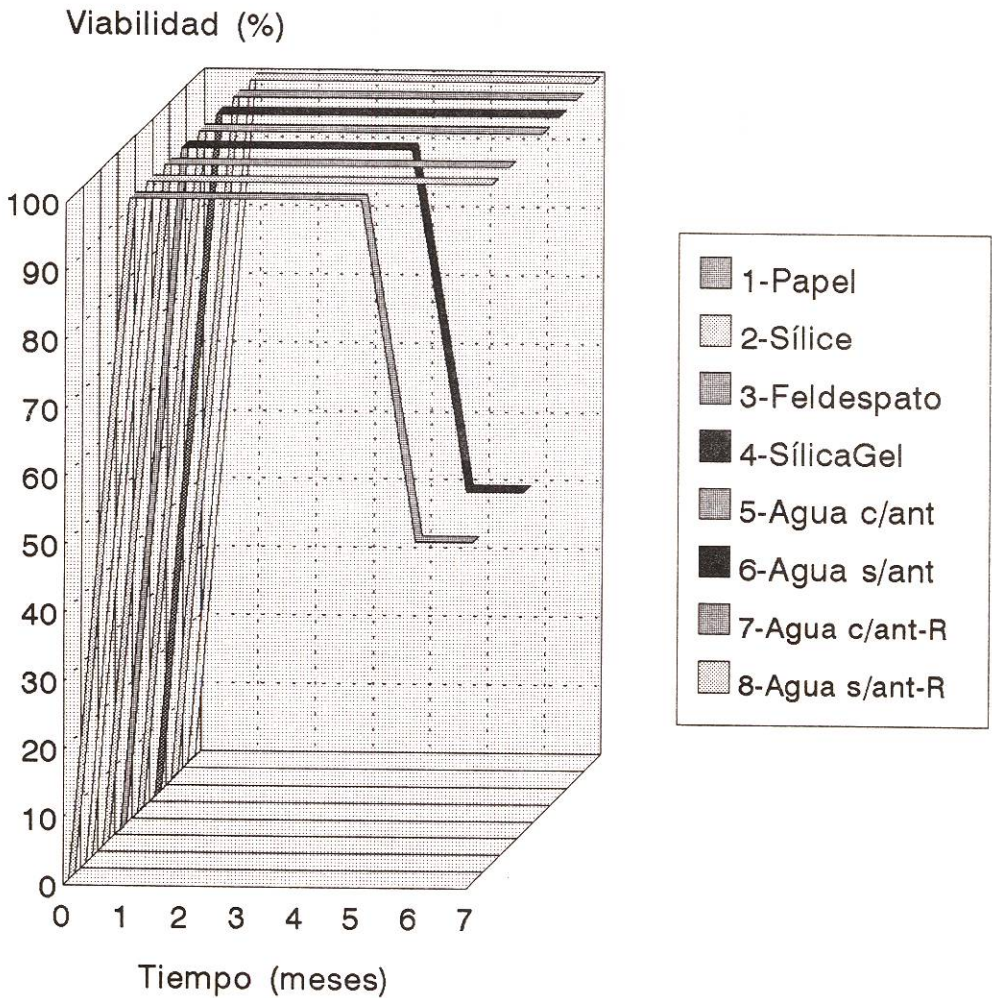


# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *F. chysogenum*





# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes T. tonsurans

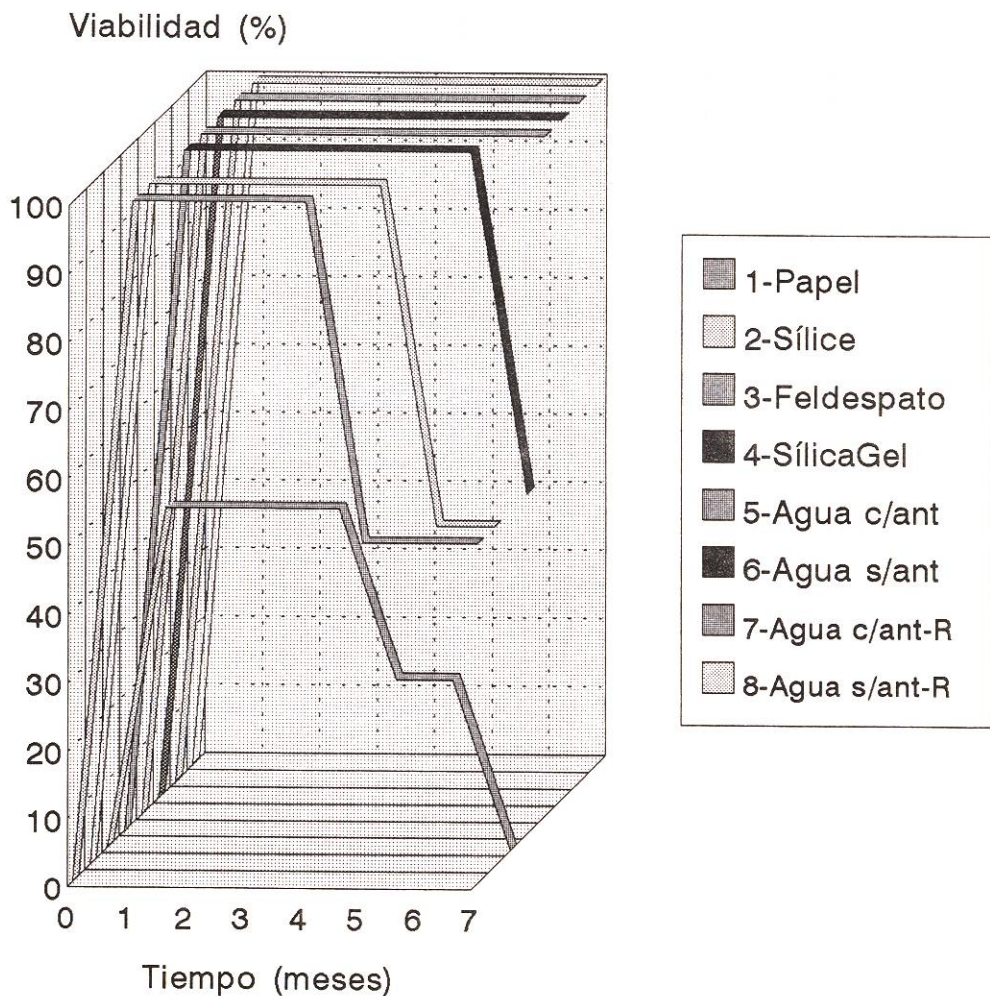


**Gráfica No. 11.** Representa el comportamiento de *Microsporium canis*. En papel hasta el cuarto mes se obtuvo una viabilidad de 100%, del quinto al séptimo mes se recuperó al 50%; en sílice hasta el quinto mes se obtuvo al 100%, del sexto al séptimo mes sólo hubo un crecimiento de 50%; en feldespató del primer mes al cuarto hubo un crecimiento de 50%, del quinto al sexto se encontró una viabilidad de 25% y al séptimo mes el crecimiento fue nulo. En los demás soportes se obtuvo una viabilidad de 100% al séptimo mes de conservación.

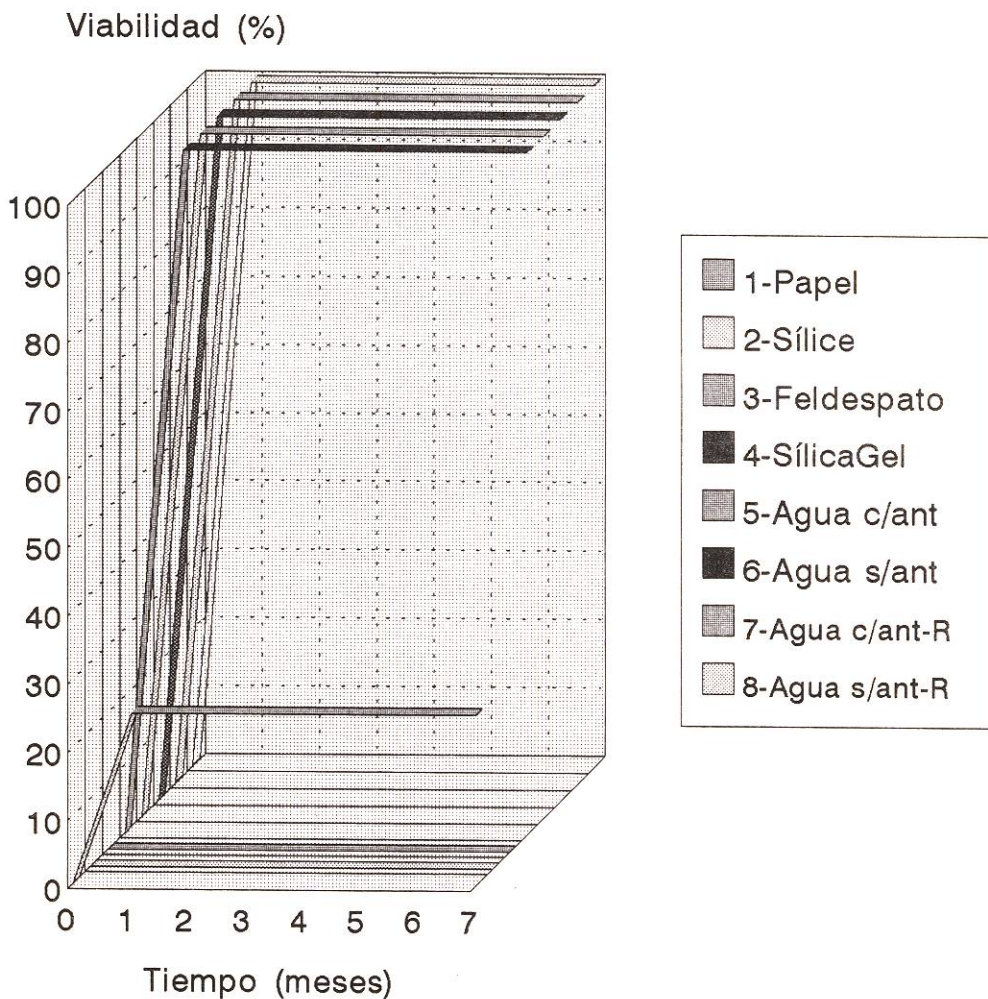
**Gráfica No. 12.** Muestra el comportamiento de *Epidermophyton floccosum*. En papel al recuperarlos se obtuvo una viabilidad de 25%; en sílice y feldespató el crecimiento fue nulo y en los demás soportes hasta el séptimo mes hubo una recuperación de 100%.



# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes M. canis



# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *E. floccosum*



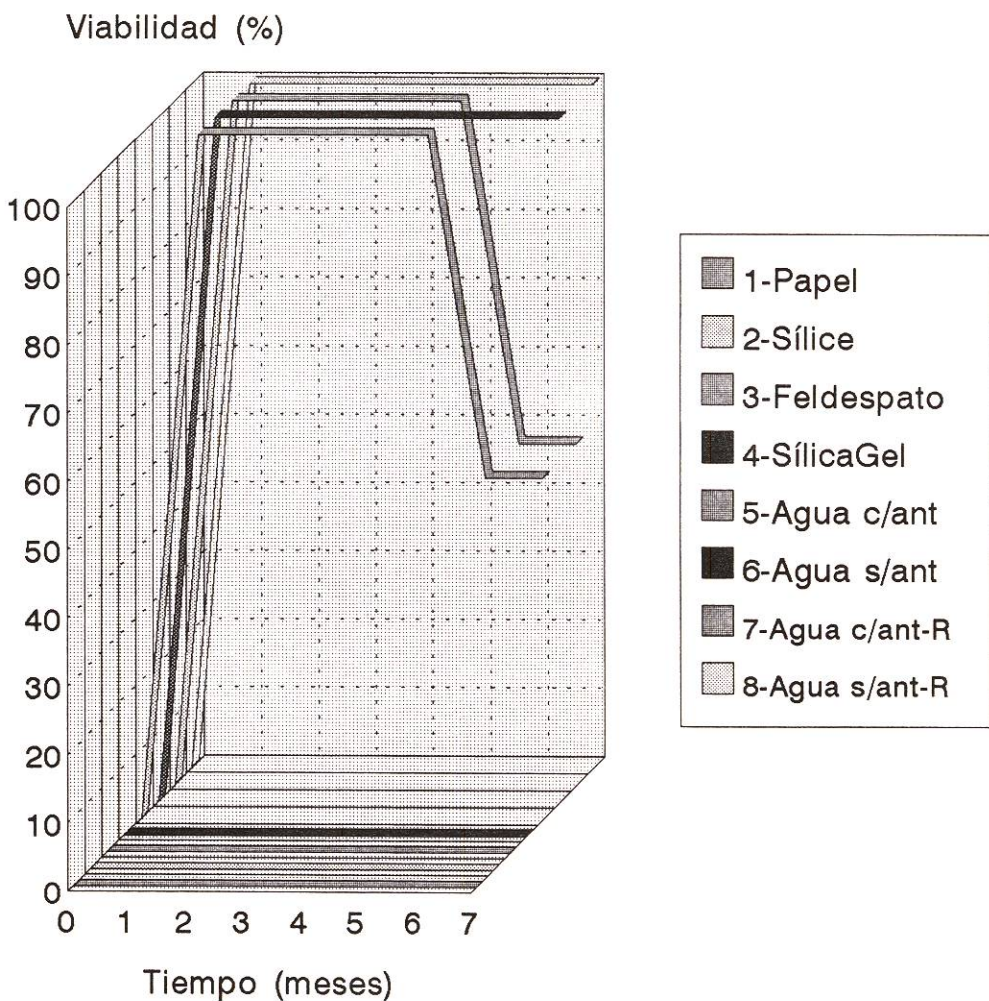
**Gráfica No. 13. Muestra el comportamiento de *Trychophyton rubrum*. En papel, sílice, feldespato y sílica gel fué nulo el crecimiento; en agua con antibiótico y agua con antibiótico en refrigeración al sexto y séptimo mes nos muestra sólo un 50% de viabilidad; en agua sin antibiótico y agua sin antibiótico sin refrigeración se obtuvo una viabilidad de 100% al recuperarlo al séptimo mes.**

**Gráfica No. 14. Representa al comportamiento de *Microsporum gypseum*, el cual en sílice y feldespato en el primer mes dio un crecimiento regular y al segundo mes fué nulo el desarrollo. Mientras que en los demás soportes se obtuvo una viabilidad de 100% al sexto mes de conservación.**

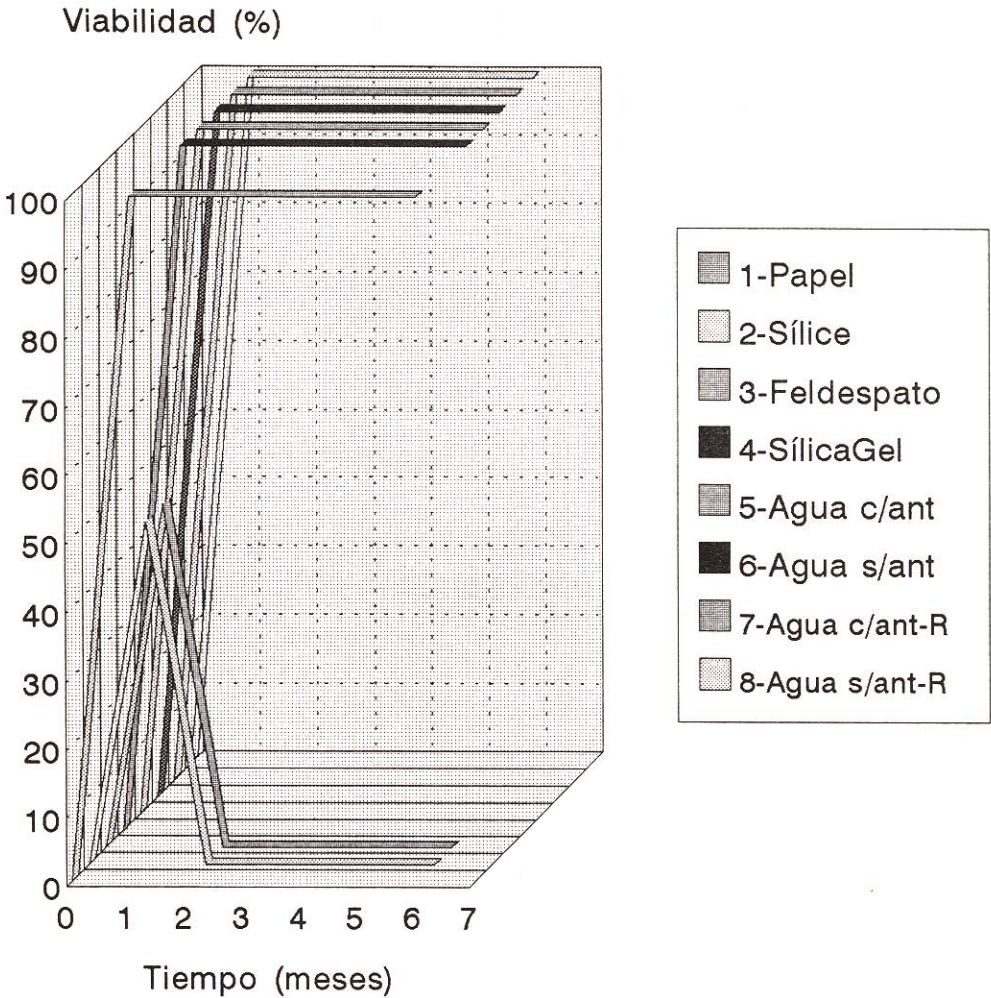
**Gráfica No. 15. Representa el comportamiento de *Trychophyton verrucosum*. En sílica gel fué nulo el crecimiento y en los demás soportes se obtuvo una viabilidad de 100% al sexto mes de recuperación.**



# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *T. rubrum*

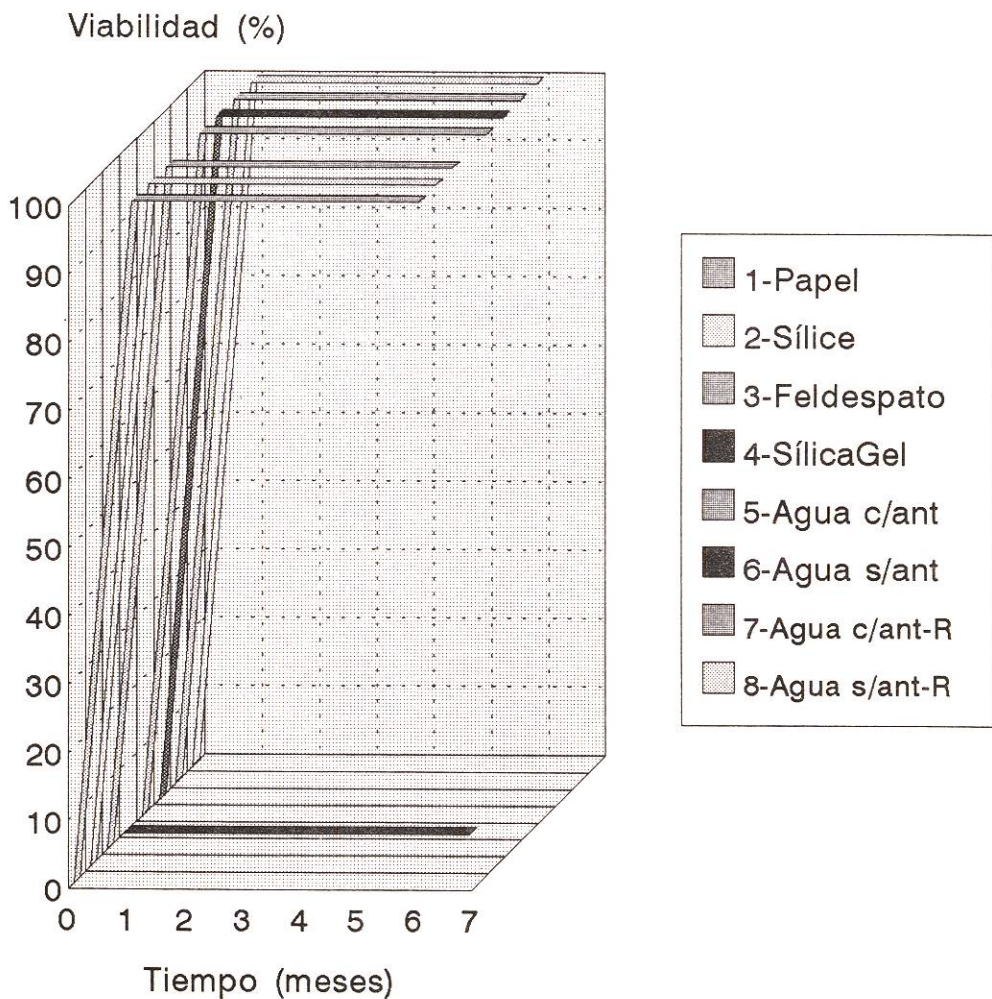


# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *M. gypseum*





# Comportamiento del microorganismo en los diferentes soportes *T. verrucosum*



**SE DETERMINO TANTO EL PORCIENTO DE VIABILIDAD COMO LA EFICIENCIA DE LA UTILIDAD DE LOS SOPORTES ESTUDIADOS.**

**PORCIENTO DE VIABILIDAD Y EFICIENCIA DE LOS SOPORTES RESPECTO A LOS HONGOS FILAMENTOSOS**

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>PAPEL</b>	<b>SILICE</b>	<b>FELDESPATO</b>	<b>SILICA - GEL</b>
1.- T. MENTALOPHYTES	100 %	100 %	100 %	100 %
2.- F. CHYSOGENUM	100 %	85.7 %	100 %	100 %
3.- T. TONSURANS	85.7 %	100 %	100 %	85.7 %
4.- M. CANIS	78.6 %	85.7 %	35.7 %	92.8 %
5.- E. FLOCCOSUM	85.7 %	0 %	0 %	100 %
6.- T. RUBRUM	25 %	0 %	0 %	0 %
7.- M. GYPSUM	100 %	8.3 %	8.3 %	100 %
8.- T. VERRUCOSUM	100 %	1005 %	100 %	0 %
<b>EFICIENCIA</b>	<b>73.6 %</b>	<b>59.9 %</b>	<b>55.5 %</b>	<b>72.3 %</b>

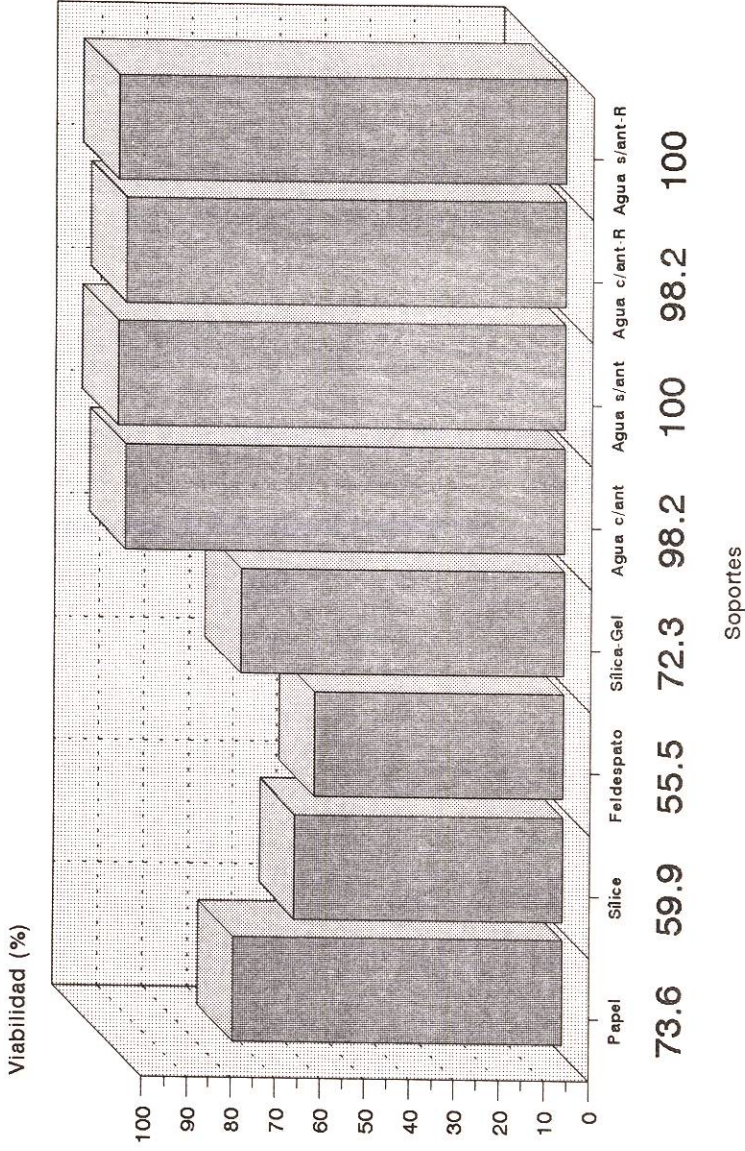
<b>MICROORGANISMO</b>	<b>AGUA C/ANT</b>	<b>AGUA S/ANT</b>	<b>AGUA C/ANT-R</b>	<b>AGUA S/ANT-R</b>
1.- T. MENTALOPHYTES	100 %	100 %	100 %	100 %
2.- F. CHYSOGENUM	100 %	100 %	100 %	100 %
3.- T. TONSURANS	100 %	100 %	100 %	100 %
4.- M. CANIS	100 %	100 %	100 %	100 %
5.- E. FLOCCOSUM	100 %	100 %	100 %	100 %
6.- T. RUBRUM	85.7 %	100 %	85.7 %	100 %
7.- M. GYPSUM	100 %	100 %	100 %	100 %
8.- T. VERRUCOSUM	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>EFICIENCIA</b>	<b>98.2 %</b>	<b>100 %</b>	<b>98.2 %</b>	<b>100 %</b>

*\* El porcentaje de viabilidad esta dado con base al promedio del tiempo de conservación. ( Partiendo del mes 1 al mes de octubre de 1993).*

*\*\*La eficiencia de cada soporte es el promedio del porcentaje de viabilidad de los microorganismos utilizados. ( Consultar gráfica B )*



# EFICIENCIA DE LOS SOPORTES RESPECTO A LOS HONGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS



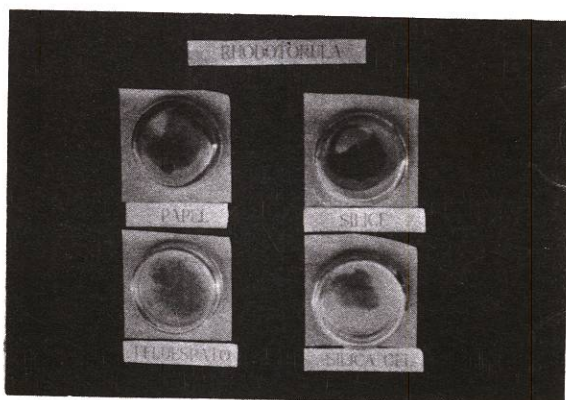
Grafica B - 61 -

**8.3 MACROMORFOLOGIA Y MICRMORFOLOGIA DE ALGUNAS CEPAS**

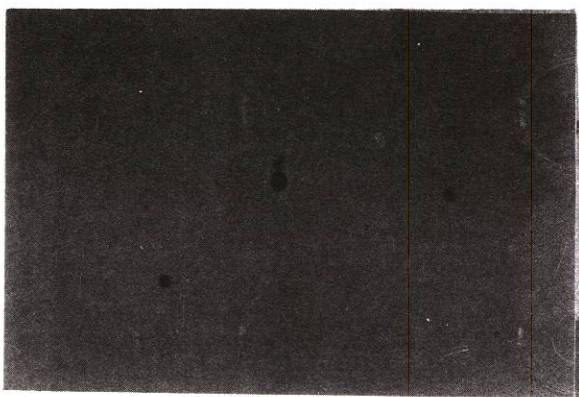
**ESTUDIADAS EN DIFERENTES REPORTES**



**1. Rhodotolura sp**



**MACROMORFOLOGIA:** La colonia es limitada mide de 2 - 3 cm en un tiempo de 4 días; de color rosa - rojo; de forma y aspectos cremosa, ligeramente acuminada y en ocasiones presenta surcos y pliegues. (3)

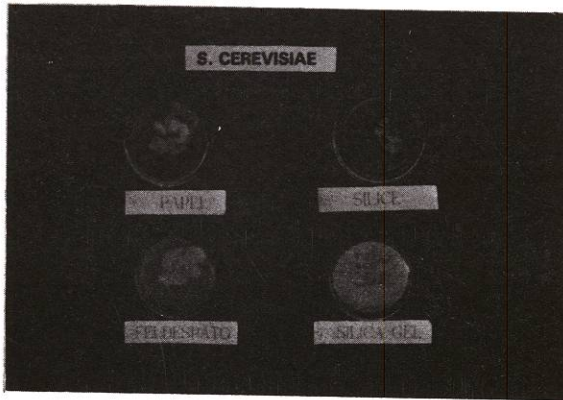


**MICROMORFOLOGIA:**

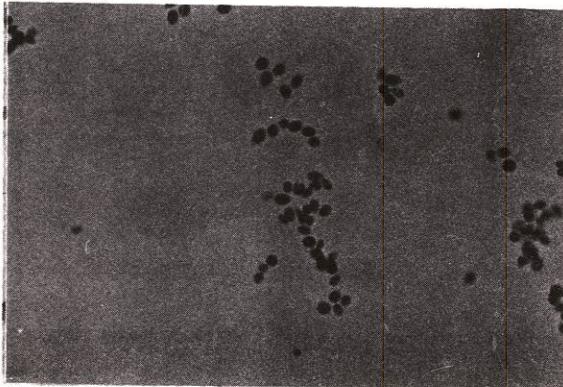
**Tipo de Pseudomicelio:** No presento

**Reproducción asexuado:** A base de blastosporas que miden de 2 - 4  $\mu$  de diámetro, con gema de la mitad de su tamaño. (3)

## 2. *Saccharomyces cerevisiae*

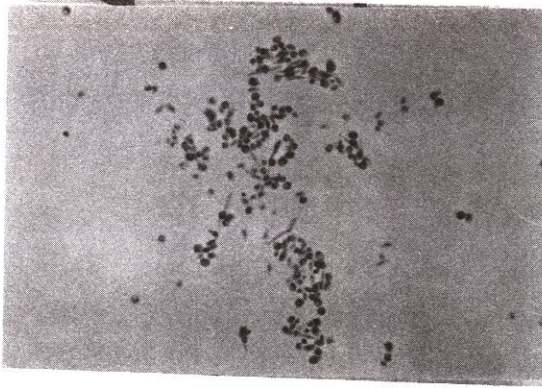


**MACROMORFOLOGIA:** Colonias cremosas, lisas en un tiempo de 4 días, después de un mes son; cremosas, brillantes cereas, blandas, lisas o ligeramente retículas. (1)

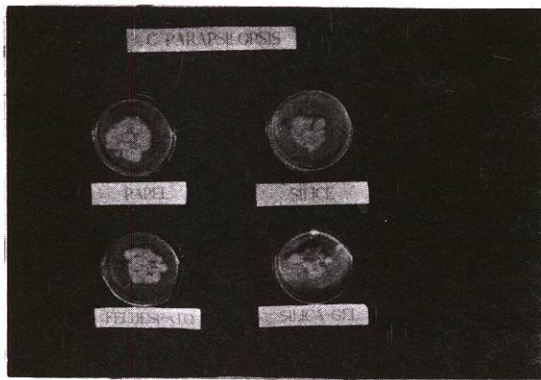


**MICROMORFOLOGIA:** Las células son ovaladas a esféricas de 3 por 5  $\mu\text{m}$ , se producen por gemación y las células pueden formar cadenas cortas y alargarse en pseudohifas. Forman ascoporas que son gram-negativas (1).

### 3. *Candida parapsilosis*

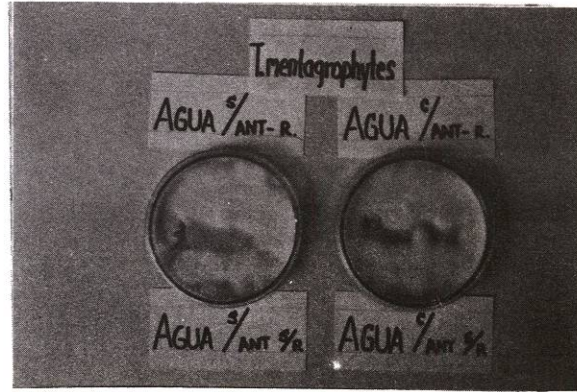
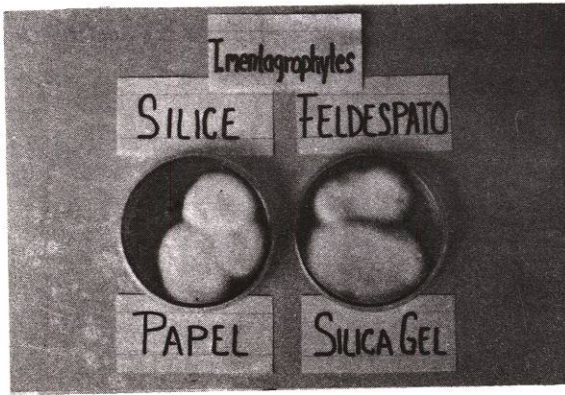


**MACROMORFOLOGIA.** La colonia crece de 2 a 3 días: suave, lisa, blanca, algunas veces transparentes; después de un mes son: cremosa, amarillenta, brillante, lisa o rugosa. (8)

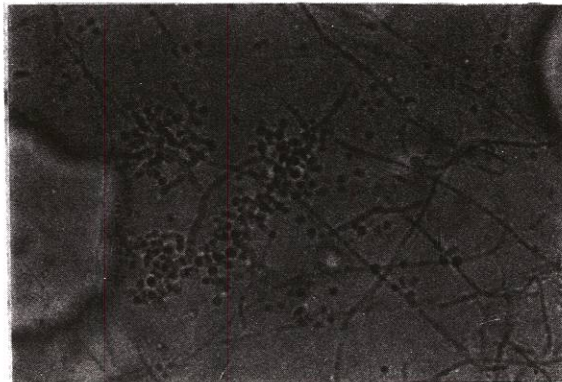


**MICROMORFOLOGIA:** Las células son ovoides pequeñas a ovoides largas (2.5 A 4 x 2.5 a 9  $\mu$ m). Presenta Pseudomicelio delgado, muy ramificado. También se encuentra Pseudamicelio grueso y células gigantes. (8)

4. *Trychophyon mentagrophytes*



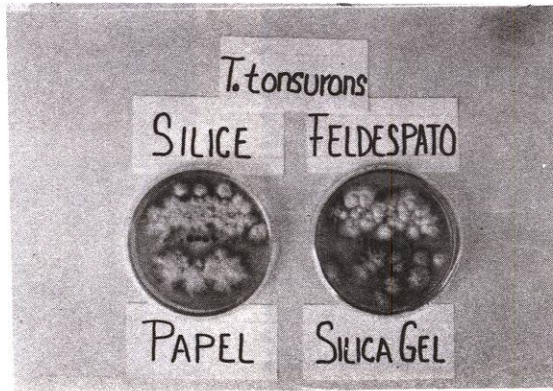
**MACROMORFOLOGIA:** La colonia se desarrolla de 8 - 12 días, es vellosa, algodonosa, seca e ilimitada, por lo regular no forma pigmento. (10)



**MICROMORFOLOGIA:** Presenta abundante micelio delgado y tabicado, se observa abundante zarcillas e hifas en espiral, presenta microconidias libres, redondeadas o piriformes; macroconidias en forma de puro de paredes lisas con 2 a 4 tabiques y miden entre 20 - 40  $\mu$  x 6 - 8  $\mu$ . (10)



5. *Trychophyton tonsurans*

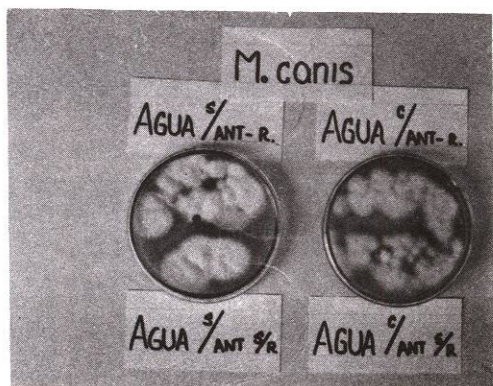
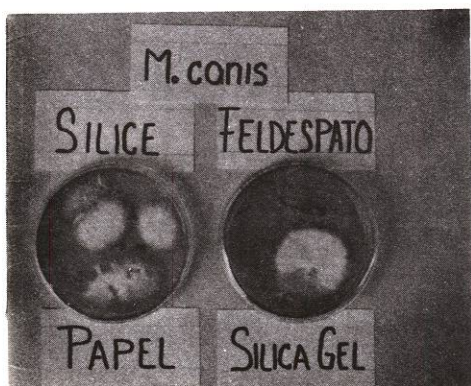


**MACROMORFOLOGIA:** La colonia se desarrolla en un tiempo de 10 a 15 días; es limitada, arteciopelada, beige a beige - café y puede presentarse de 3 formas: acuminadas, cerebriiformes o crateriformes. Al reverso se observa un pigmento café oscuro difusible (3)

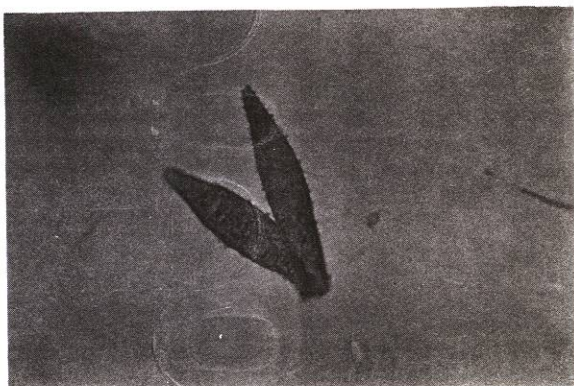


**MICROMORFOLOGIA:** Tiene hifas delgadas y tabicadas, cuando la cepa es vieja forman clamidiosporas intercalares o terminales. presenta aleuriosporas piriformes miden entre 3 - 6 $\mu$  de largo, nacen directamente de las hifas y se disponen sobre todo en forma de "cruces de Lorena". Tiene escasas macroconidias en forma de puro de 15 - 20  $\mu$  de tamaño y con 3 a 4 septos. (3)

6. *Microsporium canis*



**MACROMORFOLOGIA:** Se desarrolla en un tiempo promedio de 6 - 8 días a temperatura ambiente en ASD, las colonias son limitadas de aspecto veloso, plano, de color amarillo con micelio blanco; al reverso presenta un pigmento amarillo - naranja, que se difunde a través del medio. (10)



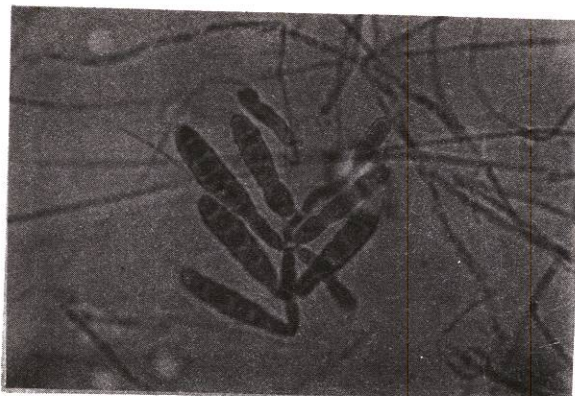
**MICROMORFOLOGIA:** Tiene abundante micelio, con hifas delgadas, tabicadas y ramificadas. Presenta gran cantidad de macroconidias de aproximadamente 50 - 100  $\mu$  de largo por 10 a 20  $\mu$  de ancho en forma de huso, poseen una membrana gruesa y en ocasiones espiculadas, con septos bien definidos por lo regular son de 6 a 12  $\mu$ . (10)



## 7. *Epidermophyton floccosum*

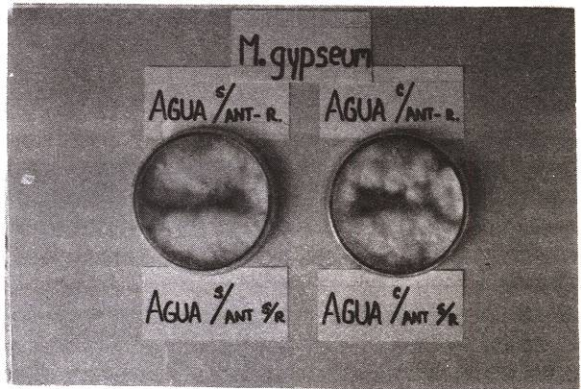
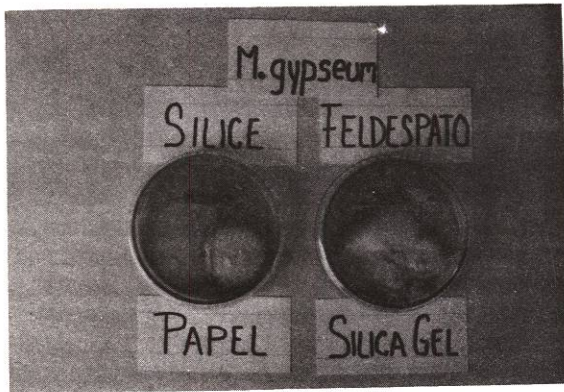


**MACROMORFOLOGIA:** Se desarrolla en un tiempo promedio de 10 - 15 días. Las colonias son limitadas aterciopeladas, de color blanco - beige, en ocasiones pueden tomar aspecto crateriforme; al reverso presenta un pigmento difusible amarillo - verdoso. (1)



**MICROMORFOLOGIA:** Tiene micelio delgado y tabicado, sólo presenta macroconidias en forma de clavos o bastos, con una base delgada y un extremo romo, miden aproximadamente (20 - 40 x 8 - 10  $\mu$ ). Cuando son cepas viejas se observan clamidiosporas intercalares y terminales. (1)

**8. *Microsporium gypseum***



**MACROMORFOLOGIA:** Se desarrolla en tiempo promedio de 8 - 10 días. La colonia es ilimitada de aspecto polvoso o arenoso, al inicio es de color blanco y posteriormente se torna beige; al reverso no presenta pigmento. (3)

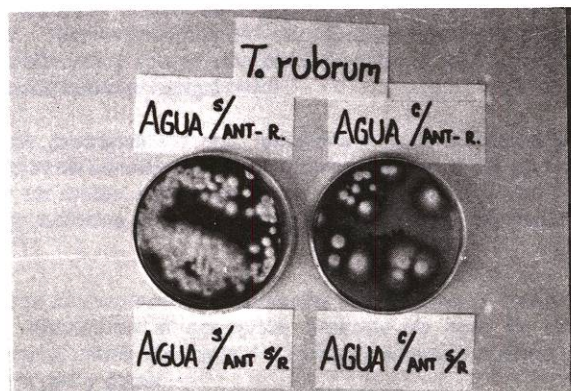


**MICROMORFOLOGIA:** Se producen macroconidias en forma muy abundante, son de paredes delgadas y tienen de 4 - 6 tabiques. Se observa variedad común de otros conidios, incluyendo microconidias. (3)



9. *Trychophyton rubrum*

Muestra el comportamiento de *Trychophyton rubrum* comprobando que cada microorganismo se comporta de diferente forma en cada método utilizado.



## **IX. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN**

*- La mayoría de los laboratorios microbiológicos deben contar con cepas puras de los diversos microorganismos que manejan y mantenerlos viables mediante diversas técnicas de conservación por largo plazo o mediano plazo. Estos métodos aseguran la preservación de los microorganismos ya sea para usarlos con fines didácticos, de investigación, industriales o para emplearlos en bioensayos.*

*- El método de preservación por subcultivos en agar usado tradicionalmente, es un método que además de consumir mucho tiempo y requerir de un trabajo intensivo, expone a las cepas a contaminación por otros microorganismos y por ácaros o a sufrir el fenómeno de pleomorfismo común en muchos géneros de hongos, trayendo como consecuencias cambios en la morfología y fisiología de los mismos, llegando en algunos de los casos a la pérdida total de una cepa. Además los hongos patógenos, al crecer en un medio artificial por varias generaciones pierden su patogenicidad.*

*- Es importante que se desarrollen métodos de preservación que eliminen los problemas encontrados al usar métodos por transferencia seriadas en agar. Estos problemas han desaparecido con los métodos usados en el presente trabajo, eliminando la posibilidad de perder una cepa, permitiendo en cambio recuperarla en el momento de que de ella se requiera.*

*- Los métodos empleados nos dieron óptimos resultados para algunos de los hongos conservados; para otros el resultado fué satisfactorio y para algunos mas no recomendables.*

*No existe un método universal de preservación que de óptimos resultados para todas las especies de hongos, cada uno responde de manera diferente según el método elegido, razón por la que se debe de tomar en cuenta las características propias de cada microorganismo así como otros factores: luz, temperatura, humedad, crioprotectores y aún el manipuleo constante que se efectúo con ellos tanto al conservarlos como al recuperarlos.*

*- El método de preservación que resultó ser más eficiente para hongos levaduriformes es el de conservación en sílice ya que se trata de un óxido ácido, que proporciona un medio adecuado para la estabilidad de las levaduras. Sin embargo los otros métodos elegidos dieron también muy buen resultado.*

*- Para los hongos filamentosos conservados en el presente trabajo los mejores resultados se obtuvieron al conservar bloques de agar en agua, tanto en refrigeración como al medio ambiente presentando también buenos resultados al conservar en sílica gel y papel.*

- Para concluir presentamos las ventajas y desventajas que nos ofrece cada uno de los métodos presentados en este trabajo y otros reportados en la literatura:

#### **1.- PRESERVACION POR RESIEMBRA.**

##### **VENTAJAS**

- *Bajo costo.*
- *No requiere de equipo especializado.*
- *Manipulación simple.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Pérdida de características morfológicas, fisiológicas, y patogenicidad.*
- *Puede haber mutación.*
- *Riesgo de contaminación.*

#### **2.- PRESERVACION EN ACEITE MINERAL.**

##### **VENTAJAS**

- *Largo viabilidad.*
- *Sobrevivencia de especies sensitivos a los demás métodos.*
- *Bajo costo.*
- *No requiere de equipo especializado.*
- *Prevención de ácaros.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Riesgos de contaminación.*
- *Reactivación demorada.*
- *Crecimiento prolongado en condiciones adversas. (Variación fenotípica y/o genotípica).*
- *Accidentes de trabajo.*

#### **3.- PRESERVACION EL PAPEL.**

##### **VENTAJAS**

- *Fácil manipulación.*
- *Material simple.*
- *Poco espacio para su almacenamiento.*
- *Ideal para envío por correo.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Demora por secamiento.*

#### **4.- PRESERVACION EN ARENA.(SILICA Y FELDESPATO)**

##### **VENTAJAS**

- *Estabilidad.*
- *Alta sobrevivencia.*
- *Inóculos sucesivos de un mismo vial.*
- *Baja infestación por ácaros.*
- *Bajo costo de material y mano de obra.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Riesgo de contaminación por manipuleo sucesivo.*

#### **5.- PRESERVACION EN SILICA GEL.**

##### **VENTAJAS**

- *Simples y de bajo costo.*
- *No requiere de equipamiento especializado.*
- *Estabilidad elevada.*
- *Los ácaros no sobreviven.*
- *Inóculos sucesivos de un mismo tubo.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Riesgo de contaminación por manipuleo sucesivo.*

#### **6.- PRESERVACION DE BLOQUES DE AGAR EN AGUA.**

##### **VENTAJAS**

- *Alta viabilidad.*
- *Sobrevivencia de especies sensitivas a otros métodos.*
- *Bajo costo de equipamiento y mano de obra.*

##### **DESVENTAJAS**

- *Dificultad de retirar el agar.*
- *Mayor riesgo de contaminación.*

*Sin embargo existen otros métodos que han probado ser mas eficientes ya que reducen el metabolismo a una extensión que induce a un estado latente. Esto se consigue por deshidratación o congelamiento (Liofilización y nitrógeno líquido respectivamente) del microorganismo.*



## **7.- LIOFILIZACION.**

### **VENTAJAS**

- *Viabilidad y longevidad elevada. (20 años)*
- *Estabilidad de características.*
- *Fácil manipulación por la liofilización.*
- *Prevención total contra la contaminación por ácaros y microorganismos.*
- *Producción en larga escala.*
- *No requiere de almacenamiento especial, sólo proteger de la luz.*

### **DESVENTAJAS**

- *Muchas especies no sobreviven.*
- *Costo elevado de mano de obra.*
- *Viabilidad posliofilización no satisfactoria.*
- *Personal especializado.*
- *Daños genéticos.*

## **8.- PRESERVACION EN NITROGENO LIQUIDO.**

### **VENTAJAS**

- *Colonias mantenidas en condiciones estables por periodos muy largos.*
- *Los límites de viabilidad no han sido registrados.*
- *Libres de contaminación.*

### **DESVENTAJAS**

- *Suprimiento continuo de nitrógeno líquido.*
- *Alta dependencia de servicios externos.*
- *Necesidad de infraestructura adecuada*

*Debemos hacer mención que estos últimos métodos no fueron probados debido a que no se cuenta con los recursos necesarios, sabemos que el presente trabajo es sólo el inicio de un ambicioso proyecto que irá tomando forma conforme se vaya contando con mayores recursos tanto económicos como humanos, hasta llegar a contar en nuestra facultad con una colección reconocida que pueda prestar servicios a otras Universidades.*

## **X. BIBLIOGRAFIA**

- 1. Bailey - Scott. Diagnóstico microbiológico. 6a Ed.  
Ed. Panamericana**
- 2. Bonifaz, Alejandro. Micología medica básica.  
Ed. Mendez Cervantes.**
- 3. Briseño, G., Guadalupe. Mantenimiento de bacterias por diferentes métodos.**
- 4. Cruz G., Rúben de la. Conservación de microorganismos.  
pp. 519 - 522**
- 5. Kirsopp B. E. y Snell J. J. S. Maintenance of Laboratory Methods.  
Academic Press Martínez Cruz.  
pp. 5 -7, 83 - 105, 107 - 121. 1984.**
- 6. Martínez Cruz Jovita. "Avance y Perpectivas"  
11: 353 - 357. Nov. - Dic. 1992.**
- 7. Muro, Marilena, A de e Luchi Marcia. Presservacao de Microrganismos.  
Fundacao Tropical de pesquisa e Tegnologia "Andre Tosello"  
1989. pp. 5 - 25**
- 8. Rippon John W. Tratado de Micología Médica.  
3a ed. México : McGraw - Hill.**
- 9. Sharp R.J. The preservation of Genetically Unstable microorganism and  
The Cryoperservation of Fermentation seed Cultures.- New York:  
Alan R. Liss, 1984 pp. 91 - 93.**
- 10. Torres Rodríguez J. M. Micosis que afectan piel y mucos.  
Ed. Doyma.**
- 11. María Del Rosario Gutierrez Hernández, Virginia Judith Juárez Martinez.  
Determinación de Agentes Etiologicos Causantes de Mastitis Clínica y Subclínica  
en Ganado Vacuno en el Estado de San Luis Potosí, Capital.**