

Jhan Pablo Agudelo Escalante, Camilo Alberto Yáñez Olivales, Laura Yolima Moreno Rozo (2023).

Aplicación y evaluación de métodos de conservación a corto y mediano plazo para hongos filamentosos y levaduras de interés industrial, agroindustrial y biotecnológico. Cuaderno Activa, 15, 71-83.



# Aplicación y evaluación de métodos de conservación a corto y mediano plazo para hongos filamentosos y levaduras de interés industrial, agroindustrial y biotecnológico

*Application and evaluation of conservation methods in the short and medium term for filamentous fungi and yeasts of industrial, agro-industrial, and biotechnological interest*

Jhan Pablo Agudelo Escalante<sup>1</sup>, Camilo Alberto Yáñez Olivales<sup>2</sup>, Laura Yolima Moreno Rozo<sup>3</sup>

**Tipo de Artículo:** Investigación.

**Recibido:** 10/01/2022 **Aprobado:** 31/08/2022 **Publicado:** 22/12/2023

**Resumen:** El presente estudio se centró en la aplicación y evaluación de las técnicas de conservación para 14 hongos filamentosos y 4 levaduras. Los métodos utilizados fueron congelación con glicerol al 10%, suspensión en solución salina al 0,85%, desecación en papel filtro y suelo, valorados a corto y mediano plazo, donde se evaluó su viabilidad por medio de la técnica de microgota, permitiendo observar su pureza y estabilidad morfológica. Se tomó un inóculo inicial, para continuar a realizar la hora cero y sus respectivas evaluaciones durante 6 meses (M1, M2, M3, M4, M5, M6), para determinar el mejor

método al cual responden las cepas de estudio. Se realizó un diseño experimental utilizando bloques al azar, con siete repeticiones y datos estadísticos mediante software ®IBM SPSS Statistics 23 prueba Duncan y una significancia de ( $\leq 0,05$ ). Como resultado, se recuperaron el 95% de las cepas evaluadas, demostrando que los cuatro métodos de conservación implementados cumplieron los parámetros de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica, debido a que mantienen las características iniciales de cada microorganismo; el mejor método de conservación fue suspensión en solución salina al 0,85% con una media de

1 Autor correspondiente: Ingeniero Biotecnológico, Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas MAJUMBA, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. jhanpabloae@ufps.edu.co. ORCID: 0000-0002-4778-3845.

2 Ingeniero Biotecnológico, Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas MAJUMBA, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. camiloyanez29@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4790-5363.

3 Microbióloga. MSc. PhD. Docente Tiempo Completo. Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas MAJUMBA, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. laurayolimamr@ufps.edu.co. ORCID: 0000-0001-8903-671X.

4,1535 (a) y viabilidad del 61,1% (a), seguido por congelación con glicerol al 10% con una media de 4,032(a, b) y viabilidad de 58,8% (a, b). Por lo tanto, se sugiere la implementación de estos dos métodos para preservar las presentes y futuras cepas de hongos filamentosos y levaduras del laboratorio.

**Palabras clave:** Hongos filamentosos, levaduras, viabilidad, pureza y estabilidad morfológica.

**Abstract:** The present study focused on the application and evaluation of conservation techniques for 14 filamentous fungi and 4 yeasts. The methods used were freezing with 10% glycerol, suspension in 0.85% saline solution, drying on filter paper and soil, evaluated in the short and medium term; where its viability was evaluated through the micro drop technique, allowing to observe its purity and morphological stability. An initial inoculum was taken, to continue to carry out zero hour and its respective evaluations for 6 months (M1, M2, M3, M4, M5, M6) to determine the best method to which the study strains respond. An experimental design was carried out using randomized blocks, with seven repetitions and statistical data using the ®IBM SPSS Statistics 23 Duncan test and a significance of ( $\leq 0.05$ ). As a result, 95% of the evaluated strains were recovered, demonstrating that the four conservation methods implemented met the parameters of viability, purity, and morphological stability, since they maintain the initial characteristics of each microorganism, the best conservation method was suspension. in 0.85% saline with a mean of 4.1535 (a) and viability of 61.1% (a), followed by freezing with 10% glycerol with a mean of 4.032 (a, b) and viability of 58.8% (a, b). Therefore, the implementation of these two methods is suggested to preserve the present and future strains of filamentous fungi and yeasts in the laboratory.

**Keywords:** Filamentous fungi, yeasts, viability, purity and morphological stability.

## I. Introducción

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología; por ello, se hace necesario conservar esta fuente microbiana y esto se garantiza mediante las colecciones de cultivos [1], [2]. Es fundamental conocer las condiciones de crecimiento y temperaturas apropiadas, las propiedades bioquímicas y las necesidades fisiológicas de cada microorganismo, así como también los métodos de preservación favorables para su conservación y mantenimiento en el tiempo [3]. La conservación microbiana contempla métodos de conservación a corto, mediano y largo plazo. La preservación a corto plazo se utiliza cuando no hay suficiente infraestructura o equipamiento, y dado que el método más utilizado para la conservación de este tipo de microorganismos es la siembra continua o repiques sucesivos.

Se ha observado que la resiembra continua o repiques sucesivos no es una técnica adecuada y muchas de las cepas bacterianas y fúngicas pierden viabilidad, y pueden presentar microorganismos contaminantes, impidiendo el mantenimiento de cultivos puros a través del tiempo, haciendo improductivo el esfuerzo del personal que ha aislado estos microorganismos. Este sistema de conservación en subcultivos seriados o repiques sucesivos es también el que tradicionalmente se ha utilizado en Colombia [4]. Con el fin de seleccionar el método de conservación más adecuado, se realizan evaluaciones de viabilidad celular, pureza e, incluso, la determinación de la actividad biológica por la cual se aisló el microorganismo [5].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad mediante dilución seriada y siembra por microgota, junto con diseño experimental utilizando bloques al azar, con siete repeticiones, obteniendo datos prácticos a través de experimentos en el laboratorio y comparándolos

con estudios estadísticos mediante software ®IBM SPSS Statistics 23 prueba Duncan y una significancia de ( $\leq 0,05$ ), La prueba Duncan forma dos subconjuntos: el subconjunto 1, integrando los hongos filamentosos y levaduras, indica que sus medias son iguales, y el subconjunto 2, integrado por los cuatro métodos de conservación; esta prueba indica una diferencia significativa entre subconjuntos. Para así seleccionar el método más adecuado para la conservación de los microorganismos dentro del laboratorio y poder estudiar su pureza con un resultado de presencia o ausencia de colonias características de cada una de ellas en el medio de cultivo seleccionado; la estabilidad morfológica se realizó comparando la siembra periódicamente con la evidencia obtenida de la cepa inicial, tanto en características macroscópicas como en estructuras microscópicas, durante un periodo de 6 meses.

## II. Metodología

### Cultivos microbianos

Los microorganismos utilizados fueron cepas de *Beauveria bassiana*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium sp*, *Isaria lilacinus*, *Isaria fumosoroseus*,

*Penicillium crysogenum*, *Penicillium roquefortii*, *Rhizoctonia sp*, *Rhizopus sp*, *Curvularia sp*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida utilis*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces ovarum* y *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales se conservaban por el método de repiques sucesivos en el Laboratorio de Investigaciones de Microbiología Avanzada de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. Estas cepas se reactivaron en medio avena (avena molida 20,0g, agar-agar 17,0g, micostatin 0,03mL, pH final:  $6,0 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ) y agar Sabouraud (glucosa 0,4g/L, pluripeptona 10 g/L, agar 15g/L, cloranfenicol 0,05 g/L, pH final:  $5,5 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ), para hongos y levaduras, respectivamente; se llevaron a incubación de 5 a 7 días/ $25^{\circ}\text{C}$ .

### Conservación de los microorganismos

Se aplicaron 4 métodos de conservación: congelación con glicerol al 10%, suspensión en solución salina al 0,85%, desecación en papel filtro y suelo. En un diseño experimental al azar por un periodo de 6 meses para evaluar su viabilidad, estabilidad y pureza de cada uno los métodos a utilizar. Los métodos que se implementaron son descritos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Métodos de conservación implementados

Método	Metodología	Material a utilizar	Referencia
1	Tubos eppendorf en congelación con glicerol al 10% estéril en ultracongelación a $-50^{\circ}\text{C}$ .	90 tubos eppendorf almacenados por separado en bolsas plásticas, con 9 tubos con muestras a evaluar y 1 blanco como control.	[1] y [6] modificado de [7]
2	Tubos eppendorf en suspensión de solución salina a 0,85% estéril en refrigeración a $4^{\circ}\text{C}$ .	90 tubos eppendorf almacenados por separado en bolsas plásticas, con 9 tubos con muestras a evaluar y 1 blanco como control.	Modificado de [8]
3	Tubos eppendorf en desecación de papel filtro estéril en refrigeración a $4^{\circ}\text{C}$ .	90 tubos eppendorf almacenados por separado en bolsas plásticas, con 9 tubos con muestras a evaluar y 1 blanco como control.	Modificado de [9]

Método	Metodología	Material a utilizar	Referencia
4	Tubos eppendorf con suelo estéril en refrigeración a 4°C, en condiciones de oscuridad.	90 tubos eppendorf almacenados por separado en bolsas plásticas, con 9 tubos con muestras a evaluar y 1 blanco como control.	Modificado de [10]

*Nota: para los 4 métodos utilizados se realizaron un total de 360 réplicas por cepa en donde se planteó de esta manera para futuras investigaciones a largo plazo.*

*Nota: Fuente elaboración propia (2023).*

### Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó un Erlenmeyer aforado con solución isotónica estéril; a cada cepa se le realizó raspado con ayuda de espátula estéril y/o hisopo estéril, permitiendo homogenizar la muestra mediante un vórtex para luego calcular la concentración inicial de cada uno de los inóculos preparados (modificado de [11]), para luego ser usados en la evaluación de cada uno de los métodos de conservación. La concentración de cada inóculo fue calculada mediante conteo directo en cámara de Neubauer ®Boeco-Bright Line. La concentración debe oscilar entre 104 y 107 células/ esporas/mL [10].

**Método de conservación por congelación con glicerol 10%:** se agregaron 500µL de la solución de glicerol al 20% a cada tubo eppendorf, para llevar a cabo la esterilización en autoclave ®Allamerican 75X a 121°C/15 Psi/15min por 3 veces. Se adicionaron 500 µL del inóculo para cada cepa en los tubos con glicerol al 20%, logrando una concentración final del crioprotector glicerol al 10%, procediendo a la conservación en ultracongelador (®Thermo Scientific-Forma 88000 Series a -50°C) [6]. Para su recuperación se retira el tubo eppendorf del ultracongelador, se verifica que esté bien sellado, y se lleva a un baño termostático a 37°C/10min, para lograr un equilibrio térmico [6], [1] modificado [7], finalmente se realiza su evaluación de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de cada cepa.

**Método de conservación por suspensión en solución salina al 0,85%:** se agregaron 500 µL de solución salina al 0,85% a cada tubo eppendorf,

siendo esterilizados en autoclave a 121°C/15 Psi/15min. Agregando 500µL del inóculo para cada una de las cepas en los tubos previamente marcados e identificados y procediendo a la conservación en refrigerador ®Thermo Scientific-Jewett a 4°C modificado [8]. Para su recuperación se retira el tubo del refrigerador y se realiza dilución seriada.

**Método de conservación en desecación de papel filtro:** se cortaron tirillas de papel filtro 0,6x1,5mm, separadas en sobres de papel Kraft y se esterilizaron en horno ®Thermo Scientific-Heratherm, a 160°C/2h. Las tirillas de papel filtro se dispusieron de manera aséptica sobre cajas Petri con agar PDA, se agregaron 5µL del inóculo sobre cada tirilla y se llevaron a incubación a 25°C/5días; posteriormente, las tirillas impregnadas del microorganismo son transferidas a las cajas vacías para su proceso de desecación a 37°C/7días. Se guardaron 4 tirillas por tubo eppendorf debidamente marcado e identificado y se llevó a refrigeración a 4°C para posteriormente realizar las evaluaciones correspondientes modificado [9]. Para el proceso de recuperación de cada una de las cepas se extrajo una tirilla de papel filtro conservada, y se suspendió en 1 ml de Tween 20 al 2% estéril, agitando en vórtex por 5seg/50rpm, liberando las células y estructuras reproductivas de la cepa, permitiendo evaluar periódicamente.

**Método de conservación en suelo:** se añadieron 0,5 g de suelo a cada tubo eppendorf, siendo esterilizados en autoclave durante tres veces a 121°C/15Psi/30min, dejando enfriar completamente, posteriormente se adicionaron se 200µL del inóculo inicial en los tubos con

suelo, previamente marcados e identificados; se llevaron a incubación a 25°C/3días; pasado este tiempo se conservaron en refrigerador a 4°C en condiciones de oscuridad modificado [10]. Para su recuperación se suspendió el contenido total de un tubo eppendorf en un vial con agua peptona estéril al 1% agitando en vórtex por 5seg/50rpm, esperando la formación de tres fases y tomando fase intermedia para proceder a realizar dilución seriada.

### Evaluación de los métodos de conservación

Con el fin de seleccionar el método de conservación adecuado, se realizaron evaluaciones periódicas para determinar la viabilidad, pureza, y estabilidad morfológica. Empleando 2 medios de cultivo específicos, agar avena para hongos filamentosos y PDA para las levaduras. Los métodos de conservación se evaluaron por un diseño experimental utilizando bloques al azar, con siete

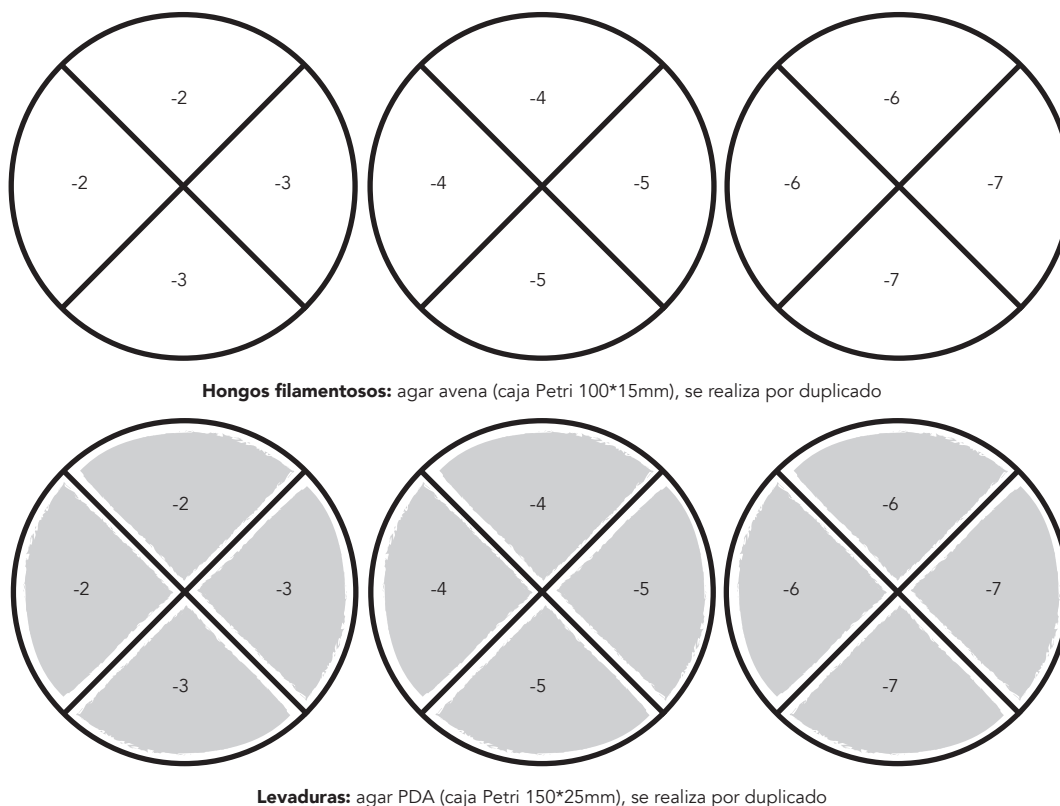
repeticiones; una evaluación inicial u hora cero, posteriormente se realizó una evaluación mensual durante los 6 meses siguientes a la conservación; retirando 3 tubos al azar con el microorganismo y el blanco por cada método; de esta forma se evaluaron 16 muestras al mes para cada cepa estudio.

**La Viabilidad** de cada una de las cepas se evaluó mediante técnica de goteo en placa o microgota, por tener buena resolución, ser rápida y económica para la cuantificación de células fúngicas [12]. La técnica consistió en realizar diluciones seriadas del inóculo y suspender una microgota en el medio de cultivo gelificado; para la dilución se dispuso de 3 series para cada método, desde la dilución 10-1 hasta 10-7 como lo muestra la figura 1, y para el sembrado de cada cepa utilizada se dispuso de cajas Petri de diferente tamaño y el medio de cultivo indicado para su crecimiento como lo muestra la figura 2.

**Figura 1.** Esquema de las diluciones usadas para la viabilidad



*Nota: Fuente elaboración propia (2023).*

**Figura 2.** Esquemas utilizados en las cajas Petri para el sembrado de las cepas

Nota: Fuente elaboración propia (2023).

Las lecturas se realizaron para los hongos filamentosos entre el día 5 y 7 luego de la siembra y para las levaduras al día 3; reportando UFC (Unidades Formadoras de Colonias/mL, UFC/mL), observando la forma de crecimiento y si presenta variación en las diferentes conservaciones. Se realizaron recuperaciones periódicas para evaluar la conservación de cada una de las cepas; es decir, que el microorganismo no variara su morfología macroscópica y microscópica. La pureza se confirmó evidenciando ausencia de crecimiento de colonias, pigmentaciones, estructuras diferentes de la cepa e implementando una prueba control o blanco para cada cepa en cada método de conservación. La estabilidad morfológica se observó con un comparativo estructural y de pigmentos con la cepa inicial, tanto macroscópicamente como microscópicamente.

### Análisis estadístico

La viabilidad de cada uno de los hongos filamentosos y levaduras se realizó mediante un recuento de la población microbiana en UFC  $\text{mL}^{-1}$  según cada método de conservación, se transformó a unidades  $\text{Log}_{10}$ . El comportamiento de esta población microbiana se cuantificó con la viabilidad a corto y mediano plazo, según la ecuación 1, y se expresó como la tasa de supervivencia del microorganismo [13].

$$\frac{X_t}{X_0} * 100 \quad [14] \quad \text{Ecuación (1)}$$

A partir de estos resultados, se realizó un análisis de varianza a través de un modelo lineal general multivariante y pruebas de comparación múltiple post hoc para las medias observadas a través

de la prueba de Duncan para un nivel de una significancia ( $\leq 0,05$ ) en el programa estadístico ©IBM SPSS Statistics 23.

## Resultados

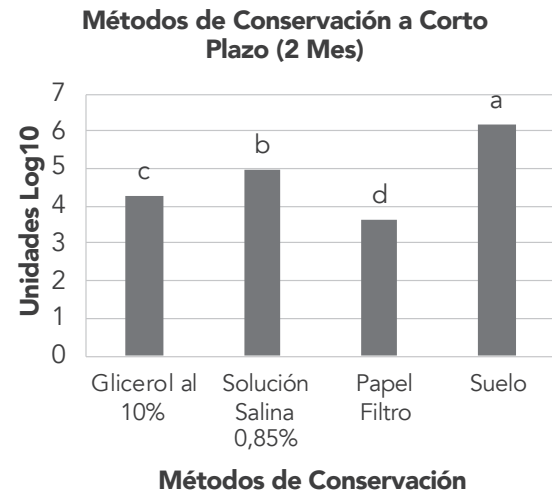
### Viabilidad

La viabilidad se consideró positiva observando crecimiento solo de colonias con las mismas características iniciales para cada hongo filamentosos y levadura, correspondientes a las cualidades morfológicas como color y textura en todos los hongos evaluados. No se observó contaminación durante todas las evaluaciones realizadas. Con respecto a los resultados a corto plazo (2 meses), para la viabilidad de los 4 métodos de conservación, el análisis estadístico de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos (a, b, c, d), mostró que el método a corto plazo más estable para las 17 cepas fue el de suelo con una media 6,1533(a), seguido de solución salina al 0,85% con 4,9631(b), glicerol al 10% con 4,2892(c) y papel filtro con 3,6033(d), como lo muestra la figura 3. El método de conservación en suelo obtuvo diferencias significativas con respecto a cada uno de los métodos, coincidiendo con resultados de investigaciones a este proceso, que explican que los conidios del hongo y blastoconidias de las levaduras posiblemente tienen afinidad con los agregados del suelo que no fueron desnaturalizados por el proceso de esterilización [15].

Así mismo, el suelo actúa como protector de los microorganismos, los cuales se adhieren a las partículas del suelo cuando ocurre la desecación con el objetivo de detener el crecimiento microbiano mediante la eliminación del agua disponible de la célula, como lo han indicado investigaciones asociadas al proceso [1], [5]. De acuerdo con ello, esta técnica también podría ser utilizada en la conservación, no solo de otros hongos filamentosos y levaduras productores de conidios y blastoconidias respectivamente, sino también de la gran mayoría de bacterias que producen células enquistadas en condiciones

adversas, como bacterias del género *Bacillus* sp formadoras de esporas, que frecuentemente son aisladas de suelo.

**Figura 3.** Porcentaje (%) de viabilidad a corto plazo

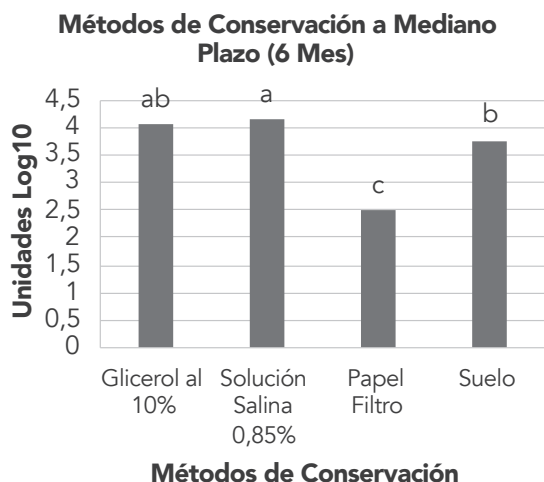


*Nota:* Fuente elaboración propia (2023).

En la figura 4, se observan los resultados para viabilidad con los 4 métodos de conservación aplicados después de 6 meses. El análisis estadístico mostró las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos (a, b, c), indicando que los métodos a mediano plazo (6 meses), más estables para las 17 cepas, fueron solución salina al 0,85% con una media de 4,1535(a) y glicerol al 10% con 4,032(a, b), suelo con 3,7612(b) y papel filtro con 2,4661(c), donde la conservación con solución salina a 0,85% y glicerol al 10% hacen parte de un subconjunto (a) indicando que no presentan diferencias significativas entre ellas; sin embargo, el método del glicerol al 10% pertenece también a otro subconjunto (b) junto con el método de conservación en suelo (b) lo que demuestra que, a pesar de estar en diferentes subconjuntos, es tan poca la significancia que en la práctica se puede implementar cualquiera de estos tres métodos, solución salina a 0,85%, glicerol a 10% y suelo, obteniendo excelentes resultados (Tabla 2); el papel filtro se encuentra en el subconjunto (c) indicando que existen diferencias significativas con todos los

métodos anteriores; aunque no pertenece a los primeros subconjuntos su diferencia, no supera en 1,5 unidades logarítmicas frente a los mejores métodos, queriendo decir que la conservación en papel filtro también podría ser una buena opción a la hora de implementar métodos de conservación a corto plazo, ya que al transcurrir del tiempo va perdiendo viabilidad como lo sugieren otras investigaciones [16].

**Figura 4.** Porcentaje (%) de viabilidad a mediano plazo



Nota: Fuente elaboración propia (2023).

La técnica suspensión en solución salina a 0,85% fue la que reportó mayor viabilidad, concordando con lo reportado con otras investigaciones que exponen que los parámetros de viabilidad y estabilidad morfológica de los cultivos microbianos aislados de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. y el mantenimiento de su pureza, indicaron que las técnicas de conservación más adecuadas fueron los viales con solución salina estéril (0,85% NaCl) y viales con suelo estéril, ambos bajo condiciones de refrigeración a 4°C [4], [6].

La técnica de congelación en glicerol al 10%, reportó un buen porcentaje de viabilidad, debido a la concentración del crioprotector que impide que se formen cristales de hielo sin ser tóxica para

los microorganismos estudiados; estos resultados coinciden con los reportados por algunos autores, indicando que los crioprotectores son sustancias que protegen del daño que se puede producir en las células microbianas en el momento de la congelación [17], [18], [19]. La temperatura utilizada en el presente trabajo para esta técnica fue favorable, coincidiendo con la aplicación de la congelación ultra fría (-50 a -80), que afirman que los mayores porcentajes de viabilidad se dan al conservar a temperatura de -70°C [20], [21].

La conservación en suelo alcanzó un valor de 3 unidades logarítmicas por debajo de la evaluación a corto plazo (2 meses), indicando que obtuvo menos valores individuales de porcentaje de viabilidad, al ser comparado con las otras dos metodologías de conservación en solución salina a 0,85% y glicerol al 10%; sin embargo, no existen diferencias significativas entre este método y el método de conservación en glicerol al 10%, determinando igualmente que la significancia entre ellos permite deducir que no existe mayor diferencia entre los tres métodos en el momento de requerir la implementación de alguno, siendo la técnica de conservación en suelo estéril, un método efectivo, de fácil aplicabilidad y eficaz, ajustándose a lo reportado por algunos autores que fundamentan que el soporte que ofrece el suelo es estable, pues se considera un material G.R.A.S. (generalmente reconocido como seguro) y no cabe la posibilidad de que contenga sustancias que, a pesar de realizar el proceso de esterilización, sigan siendo reactivas y generen detrimento del microorganismo conservado [5].

La técnica del papel filtro que se ubica en tercer subconjunto (c) evidencia la disminución de viabilidad de 1 o 2 unidades logarítmicas con respecto a la evaluación a corto plazo (2 meses); a pesar de no obtener los valores de viabilidad deseados, no deja de ser un buen método, pues es económico, no requiere de equipos sofisticados, solo papel filtro, tubos eppendorf y un refrigerador común.



**Tabla 2.** Tasa de supervivencia, según los métodos de conservación después de 6 meses

Método de conservación	Tasa de supervivencia						
	Hora 0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Glicerol al 10%	4,5924c	4,6106b*	4,2892c	3,8884b*	4,0645b*	3,7422a*	4,032ab*
NaClal0,85%	4,9076b	4,7724b*	4,9631b	4,2265b*	3,873b*	3,7682a*	4,1535a*
Papel filtro	4,0435d	3,7814c	3,6033d	3,0608c	3,271c	2,6592b	2,4661c
Suelo	5,9518a	5,5643a	6,1533a	5,3041a	4,9755a	3,5555a*	3,7612b*

(\*) Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas entre sí por el Test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

- Mayor viabilidad.
- Menor viabilidad.

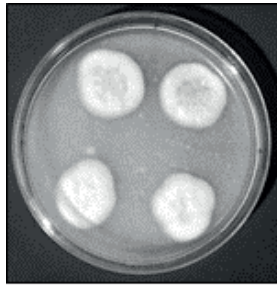
Nota: Fuente elaboración propia (2023).

Según los resultados obtenidos, se seleccionaron los métodos de conservación en tubos eppendorf con solución salina (NaCl 0,85%) refrigerados a 4°C, congelación con glicerol al 10% en ultracongelación a -50°C y viales con suelo estéril, para la conservación de los 18 microorganismos, teniendo en cuenta que fueron más presentes en el mantenimiento de la viabilidad celular y la pureza de los cultivos. Se recomendó mantener los microorganismos estudio en los tres métodos de conservación simultáneamente dentro del laboratorio.

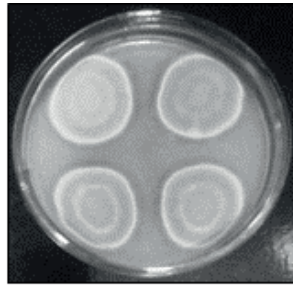
### Pureza y estabilidad morfológica

La pureza y estabilidad morfológica de las cepas evaluadas durante los 6 meses se reconoció visualmente mediante un estereoscopio (Leica 500) para su microscopia y un microscopio (Leica

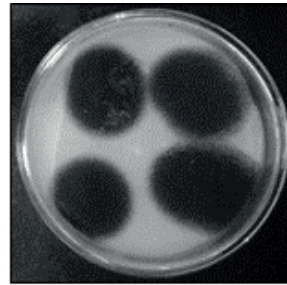
DM500) con objetivo de 40X y las levaduras con objetivo a 100X para su microscopia, buscando la presencia de contaminantes como bacterias, levaduras u otros hongos. Como resultado de esta prueba tal como se muestra en las figura 4, se observó que las cepas no fueron afectadas morfológicamente por el tiempo de conservación, ni por los métodos usados, ya que en todas las cajas evaluadas se observó únicamente crecimiento de micelio y colonias, características de cada uno de los hongos filamentosos y levaduras, lo que confirma la validez de estos métodos para mantener la pureza de hongos como lo reportan estudios de conservación microbiana, donde las cepas que se evaluaron mantuvieron su pureza en condiciones estables durante el periodo de evaluación por métodos de conservación en buenas condiciones [5], [22], [23].

**Figura 5.** Crecimiento de la morfología macroscópica y microscópica

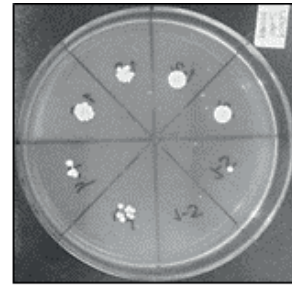
*Beauveria bassiana*  
Método congelación  
(Glicerol 10%)



*Penicillium crysogenum*  
Método Desección en  
Papel Filtro

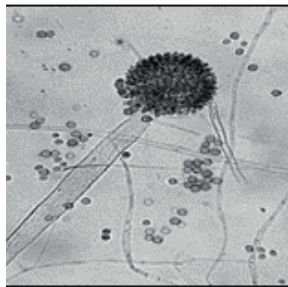


*Aspergillus niger*  
Método Suspensión en  
Solución Salina 0,85%

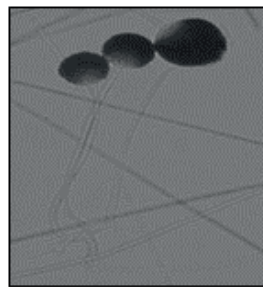


*Candida utilis*  
Método de suelo

### Macroscópio



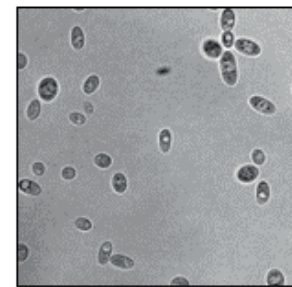
*Aspergillus flavus*



*Rhizopus sp*



*Curvalaria sp*



*Saccharomyces  
boulardii*

### Microscópio

Nota: Fuente elaboración propia (2023).

Se implementó la muestra en blanco o control, para cada una de las evaluaciones de los 4 métodos de conservación, donde se evaluó en conjunto con la viabilidad, sin presentar crecimiento alguno de microorganismos, indicando que las condiciones de asepsia del ambiente, mesones y material empleado para la conservación, siempre fueron las adecuadas para realizar la investigación, siguiendo el protocolo de desinfección empleados en el laboratorio. Los resultados obtenidos en las pruebas de pureza y estabilidad morfológica realizadas, demostraron que los métodos de conservación en estudio son aplicables para la preservación de hongos, ajustándose a lo mencionado por reportes sobre preservación de hongos, que los métodos de conservación permiten mantener su pureza y estabilidad morfológica de las cepas

almacenadas, aún después de ser mantenidas por largos periodos, incluso muchos años, sin ningún tipo de cambio de las mismas [24] y [25].

Todas las cepas de hongos filamentosos presentaron estabilidad morfológica durante el proceso de evaluación de los 4 métodos de conservación empleados, sin alterar cambios durante su crecimiento ni presentando otro tipo de estructuras miceliales diferentes a las iniciales; por otro lado, todas las cepas de levaduras también mantuvieron constantemente sus estructuras morfológicas estables, sin ser alteradas o modificadas por el tiempo de conservación; estos resultados coinciden con las afirmaciones hechas por [16], [3] y [9], quienes mencionaron que los métodos de conservación de cepas microbianas no deben afectar la

viabilidad, morfología y estabilidad de las cepas, por lo tanto los métodos evaluados en esta investigación cumplen con los objetivos de pureza y estabilidad morfológica y se pueden convertir en una buena alternativa para la preservación de hongos filamentosos y levaduras que hacen parte del Banco de Cepas del Laboratorio de Investigaciones en Microbiología Avanzada de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia.

### III. Conclusiones

Los resultados del análisis estadístico realizado a los 4 métodos de conservación aplicados en el presente estudio, para mantener hongos filamentosos y levaduras, indicaron que las técnicas más adecuadas fueron congelación con glicerol al 10% en congelador a  $-50^{\circ}\text{C}$ , suspensión en solución salina al 0,85% y conservación en suelo estéril; estos dos últimos bajo refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ , a corto y mediano plazo no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p \leq 0,05$ ), mostrando altos porcentajes de viabilidad, pureza y estabilidad en la caracterización macroscópica y microscópica de cada una de las cepas.

Los métodos de conservación evaluados y con resultados exitosos correspondientes a congelación con glicerol al 10% en ultracongelación a  $-50^{\circ}\text{C}$ , suspensión en solución salina al 0,85% y conservación en suelo estéril bajo refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ , fueron establecidos para mantener el banco de hongos

filamentosos y levaduras en el Laboratorio de Investigaciones en Microbiología Avanzada de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia, por considerarse eficaces económica y técnicamente, salvaguardando cada una de las cepas con sus características fenotípicas.

### IV. Trabajo futuro

Aumentar el tiempo de incubación para los hongos filamentosos como *Rhizoctonia* sp, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Curvularia* sp, *Fusarium semitectum*, ya que generan estructuras diferenciales, tienden a retardar su completo crecimiento, mientras que *Rhizopus* sp tiende a tener un crecimiento acelerado de esporulación, su tiempo de incubación debe ser más corto.

Completar los formatos de los bancos de cepas de los laboratorios de microbiología, mediante caracterización molecular de cada una de las cepas estudio y aplicar pruebas fisiológicas, ya que, aparte de estudiar su viabilidad frente a cada método, se estudie cómo inciden los métodos en sus actividades biológicas.

Implementar otros métodos de conservación, tanto a corto, mediano y largo plazo, que permitan seguir preservando las cepas para futuros trabajos investigativos, de tal manera que se puedan ampliar los conocimientos en la aplicación de la industria de los hongos filamentosos y levaduras, y de sus metabolitos.

## V. Referencias

- [1] Y. E. Morales., E. Duqu, O. Rodríguez,, "Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos", *Rev. Biotecnología Aplicada*, vol. 14, n°2, p. 11, 2010.
- [2] C. A. Del Puerto, E. Iglesias, T. Morales, N. Baños, M. D. Nocado MD, Carnota GY et al., "Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay", *Rev. Vaccimonitor*, vol. 18, n° 1, pp. 20-24, 2009.
- [3] M. M. Panizo, V. Reviakina, V. Rodríguez-Lemoine, M. Dolande, V. Alarcón, G. Ferrara, N. García, G. González, "Micoteca del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel: 60 años preservando la diversidad fúngica de interés médico en Venezuela", *RevSocVenMicrobiol*, n° 35, pp. 4-12, 2015.
- [4] D. M. Cárdenas Caro, Y. Sarmiento Rangel, A. Hazel Vergel, "Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos", *Rev. Colomb. Biotecnol*, vol. XV, n° 1, 2013.
- [5] I. Henao, M. Franco-Correa, G. Marín, "Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica", *Universitas Scientiarum*, vol. 11, n° 2, pp. 51-60, 2006.
- [6] J. Camero Rodríguez, M. F. Linares Gómez, *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*, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2013.
- [7] D. L. Ángel Alarcón, *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana*, (Tesis de Pregrado). Bogotá D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- [8] L. P. Bermeo Escobar, *Influencia de tres métodos de conservación sobre la estabilidad y producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. Manizales*, Colombia: Universidad Católica de Manizales, Facultad Ciencias de la Salud, 2017.
- [9] J. Camero Rodríguez, M. F. Linares Gómez, *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*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2013.
- [10] L. A. Álvarez Vivas, *Identificación, conservación y conformación de un banco de hongos filamentosos aislados previamente de los páramos de cruz verde y guasca. (Trabajo de grado)*. Bogotá D.C., Colombia: Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2011.
- [11] D. Hernández Serna, A. S. Loaiza Cano, *Selección de un Método para la Conservación y Preservación de Actinomicetos Aislados del Suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química, 2014.
- [12] Y. E. Morales-García, J. Hernández-Canseco, G. Ramos-Castillo, R. Pérez-y-Terrón, y J. Muñoz-Rojas, *Cuantificación de *Penicillium* sp. por el método de goteo en placa*. Puebla, México: Laboratorio de Microbiología Molecular, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Escuela de Biología, BUAP, CICM. Instituto de Ciencias, BUAP, 2016.
- [13] J. Muñoz-Rojas, P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, y J. L. Ramos, "Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, n° 1, pp. 472-477, 2006.
- [14] L. M. Zamora, *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero*. (Tesis de Doctorado). Gerona, España: Universidad de Girona, 2003.

- [15] P. A. Vásquez, *Evaluación de diferentes métodos de conservación para cepas fúngicas de interés agrícola*. (Trabajo de grado). Bogotá D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial.
- [16] A. C. Acosta Ovallos, *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*. Colombia: Universidad de Santander (UDES) Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Programa de Microbiología Industrial, 2019.
- [17] M. García y F. Uruburu, Colección española de cultivos tipo (CECT). La conservación de cepas microbianas. España. Universidad de Valencia, 2000. [En línea]. Disponible en: <http://www.cect.org/docs/cons.pdf>
- [18] T. Uzunova-Doneva y T. Donev: "Anabiosis and Conservation of Microorganisms", *Journal of Culture Collections*, vol. 66, n° 4, pp. 17-28, Bulgaria, 2004-2005.
- [19] D. Hernández Serna y A. S. Loaiza Cano, *Selección de un Método para la Conservación y Preservación de Actinomicetos Aislados del Suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química, 2014.
- [20] A. Hernández, *Microbiología Industrial*. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED), 2003. [En línea]. Disponible en: <http://books.google.com.co/>
- [21] R. A. Meza y A. F. Monroy, *Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas*. (Trabajo de grado). Bogotá D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial, 2002.
- [22] Y. Pinzón-Gutiérrez, S.L. Bustamante y G. Buitrago, "Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea sp.*)", *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XI, n° 2, pp. 8-18, 2009.
- [23] C. Fernández, L. Díaz, M. Illnait, C. Aragonés, G. Martínez, M. Perurena y I. Rodríguez, "Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada", *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 65, n° 3, pp. 361-369, 2013.
- [24] L. Homolka, "Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods", *Fungal Biology*, n° 118, pp. 107-125, 2024. [En línea]. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>.
- [25] K. K. Nakasone, S. W. Peterson y S. C. Jong. Preservation and distribution of fungal cultures. en *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. El sevier Academic, USA, 2004, pp. 37-47.