

REVISIÓN Y ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE LAS CEPAS
DE LA COLECCIÓN DE HONGOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
MANIZALES PARA VERIFICAR SU CONTENIDO, VIABILIDAD Y PUREZA

SOFÍA GUTIÉRREZ RAMÍREZ
LAURA VALENTINA TRUJILLO CRIOLLO

Universidad Católica de Manizales
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología
Manizales
2019

REVISIÓN Y ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE LAS CEPAS
DE LA COLECCIÓN DE HONGOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
MANIZALES PARA VERIFICAR SU CONTENIDO, VIABILIDAD Y PUREZA

SOFÍA GUTIÉRREZ RAMÍREZ
LAURA VALENTINA TRUJILLO CRIOLLO

Tesis de trabajo para optar por el título de bacteriólogas

Director: Sebastián Escobar Vargas
Biólogo M.Sc.

Universidad Católica de Manizales
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología
Manizales
2019

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a nuestro director Sebastián Escobar Vargas por el acompañamiento y apoyo en todos los procesos realizados durante el proyecto de grado, todo gracias a su conocimiento y experiencia. Le queremos agradecer, además, por permitirnos realizar este trabajo y por toda la confianza depositada.

Agradecemos a la Universidad Católica de Manizales por la colaboración en cuanto a la disponibilidad en todo momento de las instalaciones, equipos y materiales requeridos para el desarrollo del proyecto.

Queremos hacer un reconocimiento también a nuestros padres que nos acompañaron en este proceso ayudándonos a fortalecernos emocionalmente cada día para así no desfallecer y poder culminar con nuestro trabajo de grado, dándonos también el apoyo económico para los días adicionales al semestre que se utilizaron para realizar adelantos de nuestro trabajo.

Por último agradecemos al semillero de conservación de hongos y bacterias (COHOBAC) por hacernos partícipes de uno de sus proyectos, permitiéndonos crear tanto responsabilidad y destreza en nuestras capacidades como también un pensamiento crítico y autonomía en cada decisión tomada.

Tabla de contenido

1. Introducción	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo General	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. Marco Teórico	11
3.1. Lineamientos para el establecimiento de colecciones de microorganismos.	11
3.2. Características de la Colección de Microorganismos de la UCM	12
3.2.1. Tipo de colección	12
3.2.2. Grupos taxonómicos preservados	12
3.2.3. Métodos de preservación	13
3.2.4. Nivel de catalogación y sistematización	16
3.2.5. Documentación	16
3.3. Generalidades de los hongos	18
3.3.1. Clasificación de los hongos según su hifa o micelio	19
3.4. Características de los géneros encontrados en la colección de la UCM	20
4. Materiales Y Métodos	22
4.1 Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales	22
4.2 Método de cultivo	22
4.3 Montaje de placas	23
5. Resultados	24
5.1 Presencia y ausencia de aislamientos registrados en la base de datos.	24
5.2 Porcentaje de presencia, viabilidad y pureza de las cepas de hongos de la colección de la UCM.	28
5.3 Observación macroscópica y microscópica.	30
6. Discusión	39
7. Conclusión	42
8. Bibliografía	43

Índice de tablas

Tabla 1. Ausencia, presencia y tiempo de crecimiento de los microorganismos.	25
Tabla 2. Cantidad de asilamiento y código de la base de datos por cada género y especie aislado.	30

Índice de figuras

Observación macroscópica y microscópica

Figura 1. Porcentaje de aislamientos presentes en el freezer -80°C de cada subcolección.	29
Figura 2. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000215)	31
Figura 3. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000216)	31
Figura 4. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000217)	32
Figura 5. <i>Cladosporium lignicola</i> (GIBI_000218)	32
Figura 6. <i>Fusarium equiseti</i> (GIBI_000221)	33
Figura 7. <i>Penicillium olsonii</i> (GIBI_000222)	33
Figura 8. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000224)	34
Figura 9. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000225)	34
Figura 10. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000226)	35
Figura 11. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000227)	35
Figura 12. <i>Penicillium brevicompactum</i> (GIBI_000228)	36
Figura 13. <i>Unknown</i> (GIBI_000354)	36
Figura 14. <i>Unknown</i> (GIBI_000355)	37
Figura 15. <i>Fusarium oxysporum</i> (GIBI_000356)	37

Resumen

Hoy en día algunas personas pertenecientes al campo de la ciencia y la investigación, aún no conocen la importancia de las colecciones de microorganismos, y las tantas cosas que se pueden realizar con ellas una vez se conocen sus políticas, el adecuado manejo de estas y la forma de vivir de los microorganismos. En este proyecto se presenta un estudio de la micoteca de la Universidad Católica de Manizales, brindando información de su estado, utilidad y de temáticas básicas de los hongos como lo es su composición, estructura y forma de vida.

Teniendo en cuenta los aspectos de presencia- ausencia, viabilidad y pureza de la micoteca, se realizó un inventario de la colección de hongos de dicha institución, pudiendo corroborar la información ya presente en la base de datos y dar a conocer el estado de ésta a partir de los porcentajes obtenidos para cada aspecto en particular; para esto se observó cómo fue su desarrollo y comportamiento ante las siembras realizadas. Teniendo el hongo aislado en agar PDA y sin contaminación alguna, se procedió a realizar la observación de la morfología macroscópica y montaje en placa con azul de lactofenol para observar su morfología microscópica, obteniendo las respectivas fotografías, para de esta manera realizar un análisis en cuanto la presencia o ausencia del microorganismo, viabilidad y pureza.

A partir de lo anterior, se pudo determinar que las cepas presentes en la colección conservan las características nombradas anteriormente, aunque se debe hacer una revisión de la base de datos, ya que hay unas cepas que no se encuentran presentes, por lo tanto hay información que se debe de corregir o replantear lo que ya está estipulado en la base de datos para completar la colección.

1. Introducción

Muchas instituciones y centros de investigación cuentan con colecciones de cultivos de microorganismos, las cuales tienen como finalidad la conservación a largo plazo de las cualidades bioquímicas, el mantenimiento de la viabilidad genética y la preservación de las estructuras morfológicas de los microorganismos colectados, evitando mutaciones causadas por factores como la temperatura o la manera en que los especímenes son preservados. Las actividades de la colección permiten que los especímenes puedan ser utilizados para realizar trabajos de investigación básica, control de calidad, investigación en el desarrollo de procesos biotecnológicos, así como también para suministrar material biológico a otras instituciones o a actividades internas de la institución asociada a la colección, como por ejemplo, docencia entre otras. La Universidad Católica de Manizales (UCM) cuenta con una micoteca, la cual tiene como principal finalidad preservar microorganismos con potencial en la obtención de productos de interés agroindustrial.

En ocasiones, las colecciones de microorganismos pueden presentar problemas en cuanto a la viabilidad, calidad o sistematización de la información de los especímenes colectados. En el caso de las cepas de la micoteca de la UCM, hay una deficiencia en cuanto a la información que describe en qué grupos se encuentran organizadas dichas cepas dentro del freezer de -80°C ; ya que en el momento de la revisión de la base de datos, el grupo de referencia (RF) y de industria (IN) se encontraron ausentes y sin documentación que argumentara la ausencia de los mismos. En el mencionado freezer de -80°C se registraron solamente aislamientos de agroindustria (AG). Es importante que la información de toda colección sea supervisada y verificada por una persona que conozca completamente cómo se encuentra conformada, que tenga experiencia en cuanto a las condiciones de crecimiento de los especímenes contenidos, de su preservación y taxonomía, promoviendo de esta forma una buena administración a largo plazo.

Los aislamientos preservados también pueden presentar problemas de su viabilidad y calidad, lo cual se puede ver reflejado en el tiempo en que se demora en crecer cada cepa, su morfología y pureza de los cultivos. Este problema puede ser producto de una mala preservación y control que se les realizan a las cepas, pues en muchas ocasiones no se tiene una revisión periódica y consecutiva del microorganismo en el laboratorio (cultivo y aislamiento), ya que no siempre hay personal disponible para realizar dicho proceso; teniendo como consecuencia la muerte de la colección.

El trabajo de análisis de las cepas existentes en la colección de la UCM permite actualizar el inventario para certificar la presencia de material que efectivamente existe y que se encuentra viable, así como para recuperar aislamientos que pueden encontrarse afectados por problemas de contaminación. Esta información es útil ya que contribuye a generar planes para la incorporación de nuevos aislamientos de interés para el aumento de la cobertura taxonómica de la colección, así como para verificar el funcionamiento de los métodos de preservación utilizados. Estas actividades se realizan con miras a aportar al establecimiento de una colección que pueda prestar de forma eficaz y confiable servicios tanto académicos como comerciales a la comunidad en general.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Verificar el estado de la colección micológica contenida en la Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener un inventario claro de las existencias de los hongos en la Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales.
- Contribuir al ordenamiento de la colección micológica con miras a la obtención del Registro Nacional de Colecciones Biológicas.
- Aportar información para la generación de estrategias administrativas y técnicas para la mejora de la colección.

3. Marco teórico

3.1. Lineamientos para el establecimiento de colecciones de microorganismos.

Para el establecimiento de colecciones de microorganismos, se deben tener en cuenta varias normativas y documentos ya estipulados por la ley, con el fin de mantener un material legal y de calidad para ser utilizado con un fin en particular o para ser puesto a disposición de otras instituciones o empresas.

Las colecciones biológicas se definen como el “conjunto de especímenes de la diversidad biológica preservados bajo estándares de curaduría especializada para cada uno de los grupos depositados en ella, los cuales deben estar debidamente catalogados, mantenidos y organizados taxonómicamente, de conformidad con lo establecido en el protocolo de manejo respectivo, que constituyen patrimonio de la Nación y que se encuentran bajo la administración de una persona natural o jurídica, tales como herbarios, museos de historia natural, bancos de germoplasma, bancos de tejidos y ADN, genotecas y ceparios y las demás que el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS) así lo considere” (Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, Decreto 1375 del 2013). Mediante el Decreto 1375 del 2013, el Gobierno de Colombia y el MADS, delegan las actividades de registro, seguimiento y administración de las colecciones biológicas al Instituto Alexander von Humboldt (IAvH).

Para el establecimiento de colecciones biológicas se requiere la suministración de cierta información ante el IAvH, que incluye: grupos taxonómicos preservados, medios de preservación utilizados, el tipo de colección, nivel de catalogación y de sistematización, y se requiere la incorporación de unos documentos adjuntos (Guía de registro y actualización de colecciones biológicas (Díaz, González, & Soacha-Godoy, 2015) que incluyen: el documento por el cual se crea la colección, certificado de existencia de la institución titular, copia de documento de identificación del titular de la colección, formato de auto declaración, los

documentos que acrediten la obtención legal de los especímenes y el protocolo de manejo de la colección (Guía de registro y actualización de colecciones biológicas (Díaz et al., 2015).

3.2. Características de la Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales

3.2.1. Tipo de colección

De acuerdo con la Guía de Registro y Actualización de Colecciones Biológicas, se pueden distinguir colecciones de tejidos, colecciones genéticas, colecciones de cultivos celulares, colecciones vivas (jardines botánicos y zoológicos), museos y herbarios. Dentro de las colecciones de tejidos se incluyen los tejidos de plantas o animales; en las colecciones genéticas se encuentran muestras biológicas almacenadas para ser utilizadas en el futuro; en las colecciones de cultivos celulares se preserva todo material biológico que es intencionalmente cultivado y se mantiene viable; en las colecciones vivas se incluyen, como ya se mencionó, los jardines botánicos y los zoológicos; en los museos se deposita principalmente material zoológico fijado y preservado; en herbario se preservan estructuras vegetales fijadas (Díaz et al., 2015).

La micoteca de la CMUCM es una colección de tipo de cultivos celulares, pues allí se incluyen aquellas colecciones que contienen líneas celulares o microorganismos.

3.2.2. Grupos taxonómicos preservados

La Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales (CMUCM) es un espacio dedicado a la preservación de hongos y bacterias, obtenidos a partir de muestras ambientales, enfocándose principalmente en la preservación de microbios aislados del suelo, de residuos agroindustriales, o de ambientes asociados a la actividad agrícola. El presente trabajo se concentra en los especímenes pertenecientes al grupo de los hongos filamentosos depositados en la colección.

3.2.3. Métodos de preservación

Tratándose de una colección de cultivos celulares, es fundamental preservar la viabilidad de los aislamientos conservados en la CMUCM. Los diferentes medios de preservación permiten conservar características específicas de los microorganismos como lo son su morfología y fisiología (fenotipo), y su genética (genotipo). Para elegir el método de preservación adecuado, se deben tener en cuenta diferentes aspectos como: (1) Tipo de microorganismos a conservar, teniendo en cuenta también si son patógenos o no para los humanos, animales o plantas y si producen compuestos tóxicos, pues se deben etiquetar de una forma específica y tomar medidas de seguridad. (2) Tiempo de conservación: existen métodos a corto, mediano y largo plazo.

Los métodos de conservación a corto plazo consisten en el repique periódico del cultivo inicial en un medio nutritivo fresco. Los repiques pueden durar entre 15 y 20 días si se almacenan en refrigeración (4⁰C). Este método no es muy recomendado, ya que tiene algunas desventajas, entre las cuales se encuentran la alta probabilidad de contaminación de los cultivos y mutaciones genéticas. (Jazmin, 2013). *Los métodos de conservación a mediano plazo* son útiles y viables por un lapso de tiempo de 2 a 5 años. “Se puede utilizar la desecación en diferentes soportes (arena, sílica, gel) donde se detiene el crecimiento debido a la eliminación del agua disponible; así como el almacenamiento en tierra, parafina líquida, aceite mineral estéril o suspensión en agua estéril”. (Jazmin, 2013). *Los métodos de conservación a largo plazo* son útiles y viables por diez años o más. Entre estos métodos se encuentra la congelación o crio preservación y la liofilización.

Los métodos de conservación existentes en la colección de hongos y bacterias de la UCM, son: desecación en papel filtro, crio preservación, aceite mineral y agua destilada. Los que aplican para la conservación de hongos son la criopreservación, aceite mineral y agua destilada. A continuación, se describen brevemente estos métodos.

3.2.3.1. Preservación mediante criopreservación

La criopreservación es un método de conservación a largo plazo muy útil. Al someterse los microorganismos a temperaturas tan bajas, se detiene el metabolismo de estos y por ende sus funciones vitales, lo que los mantiene vivos sin cambios en su estructura.

Es importante conocer que las cepas preservadas por éste método pueden sufrir lesiones si no se hace uso de un crioprotector, y, a su vez, causar efectos negativos al microorganismo en la etapa de reactivación. “Las lesiones por congelación ocurren a raíz de que los cristales de hielo perforan o separan las células, destruyéndolas por acción mecánica directa, o pueden ocurrir efectos secundarios a través de cambios en la composición de la fase líquida. Los crioprotectores tienen como función el aumento de la concentración total de todos los solutos en el sistema, reduciendo la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura dada; pero para ser biológicamente aceptables, deben poder penetrar en las células y tener baja toxicidad. Muchos compuestos tienen tales propiedades, incluyendo el glicerol, dimetilsulfóxido, etanodiol y propanodiol.” (PubMed, principios de la conservación (Pegg, 2007).

Existen diferentes tipos de crio preservación, de acuerdo a la temperatura utilizada para la preservación de los microorganismos. Entre estos se encuentran: Congelación ordinaria, congelación ultra fría y congelación con nitrógeno líquido.

Congelación Ordinaria

La congelación ordinaria es un tipo de criopreservación que mantiene temperaturas de -5 a -20°C. En este intervalo, los microorganismos permanecen viables por uno o dos años (Hernandez, 2003).

Congelación Ultra fría

Para este proceso, el cultivo se suspende en un medio con glicerol o DMSO (crioprotector). La suspensión se coloca en tubos especiales. La congelación ultra

fría se efectúa en congeladores mecánicos, a temperaturas entre -50 y -80°C (Hernandez, 2003).

Congelación con nitrógeno líquido

La congelación con nitrógeno líquido es el método de conservación por congelación más recomendado para garantizar la preservación de los microorganismos a largo plazo. Este método utiliza nitrógeno líquido, porque se logran temperaturas de -150 a -196°C. El metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C; por esta razón, si el microorganismo soporta el proceso de congelación, su viabilidad se mantiene durante muchos años (Hernandez, 2003).

3.2.3.2. Preservación con aceite mineral

El principio de la preservación con aceite mineral radica en cubrir el cultivo con aceite mineral estéril, para de este método reducir los niveles de oxígeno para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados, y disminuir la tasa de actividad metabólica de los microorganismos ya cultivados. De este modo se pueden mantener las características de los aislamientos intactas, sin ningún tipo de cambio mientras se almacenan a temperatura ambiente. Además de esto también sirve para evitar la degradación celular (secado), el cual es un problema frecuente si se almacenan en congelación (Uzunova & Donevs, 2005).

3.2.3.3. Preservación en agua destilada estéril

La preservación en agua destilada estéril consiste en transferir una parte de una colonia que se encuentre en crecimiento activo, a viales estériles que contengan 1 ml de agua destilada estéril. Esto se debe de realizar en la cámara de extracción de vapores con el fin de evitar contaminación. Se recomienda realizar la transferencia por duplicado por cada cepa perteneciente a la colección, almacenándose a temperatura ambiente (Palacio, Gutiérrez, Rojas, Atehortúa, & Zapata, 2014).

3.2.4. Nivel de catalogación y sistematización

El nivel de catalogación y sistematización está dado según la forma en que se encuentra organizada la información de una colección y la forma de accesibilidad a esta. Se pueden clasificar en: sin catalogar, sólo en catálogo escrito, sólo en base de datos, catalogados por escrito y en base de datos. Es importante que los datos de las colecciones se encuentren bien administrados, siendo archivados correctamente y teniendo en lo posible registros secundarios o copias de la información original, al igual que duplicados de las cepas pertenecientes a la colección (Llorente-Bousquets, Koleff-Osorio, Benitez-Diaz, & Morales, 1999). A partir de lo anterior, la colección de la UCM se encuentra sólo en base de datos, la cual ha permitido una fácil accesibilidad a la información registrada.

3.2.5. Documentación

Uno de los elementos más relevantes que deben ser incluidos en la documentación es el protocolo de manejo. Existen lineamientos para el desarrollo de protocolos de manejo para herbarios y colecciones zoológicas de uso común en Colombia (IAvH, 2015). Sin embargo, en cuanto a microorganismos no existen guías nacionales específicas para el desarrollo de este tipo de colecciones. El IAvH recomienda la implementación de las recomendaciones de la OCDE para el manejo de colecciones microbiológicas. A continuación se desglosan algunos aspectos relevantes del protocolo de la OCDE relacionados con la colección de microorganismos de la Universidad Católica de Manizales.

Según el protocolo de la OCDE, para el manejo de las colecciones microbiológicas se deben tener en cuenta varios aspectos como: el financiamiento, personal idóneo, materiales de calidad, documentación adecuada. La colección de la UCM cuenta con el Centro de Investigación, Proyección y Desarrollo como primera fuente de financiamiento con el fin de acceder a recursos económicos para su ejecución. La propuesta fue avalada en el año 2009 debido a su pertinencia y viabilidad.

Las colecciones requieren de personal idóneo dedicado a las actividades inherentes a estas. La CMUCM, tiene estipulado en su protocolo de manejo, que el personal que maneja la colección debe ser especializado, además de esto cuenta con personal capacitado para tomar los cargos de coordinador, curador, y de la parte administrativa de la colección.

“Para la documentación es necesario llevar registros de cada cepa conservada, los cuales deben de incluir la siguiente información: lugar, sustrato o huésped, la fecha de aislamiento, nombre de la persona que la aisló, nombre de la persona que identificó, el método en el cual fue conservada la cepa, medio de crecimiento óptimo y temperatura y datos sobre características bioquímicas (World Federation for Culture Collections, 2010).

La colección de la UCM cuenta con un registro en base de datos, en el cual se especifican con claridad los aspectos anteriormente nombrados, exceptuando el medio de crecimiento óptimo y temperatura y los datos sobre las características bioquímicas, así como los datos de origen de la colecta.

Es recomendable que las colecciones cuenten con cepas de referencia para tener un control de calidad de los medios, cepas y validación de métodos, las cuales deben tener garantizadas su pureza y la conservación de sus características fenotípicas y genotípicas originales. Es muy importante evitar el deterioro, contaminación cruzada o mutaciones de estas cepas. Esto se evita con una buena conservación y evitando muchos repiques de esta; pues de no ser así no se tendría una referencia que pueda indicar una buena calidad de una colección (González-González, 2008).

3.3. Generalidades de los hongos

Los hongos pertenecen al reino fungi. Se han clasificado como organismos eucariotas, los cuales tienen dos clases de reproducción: una sexual y la otra asexual, “El DNA está organizado en cromosomas que se hallan envueltos por la envoltura nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas está limitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida formada por polisacáridos complejos, compuesta mayoritariamente por quitina, mananosa y glucanos”. La quitina protege al hongo en condiciones ambientales estresantes (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Los hongos al poder realizar el proceso de absorción, pueden obtener su energía para reproducirse, en especial de la materia orgánica (microbiología clínica 2007). La nutrición de los hongos puede ocurrir de dos maneras: de forma saprofítica, aprovechando materia orgánica en descomposición, o cuando ya pasa a ser un parásito el cual consiste en nutrirse de una materia viva (Bonifaz-Trujillo, 2015).

También se pueden clasificar como unicelulares o pluricelulares. Ambos tipos de hongos son totalmente diferentes en su constitución, ya que el unicelular está compuesto solo por células aisladas llamadas levaduras, y el pluricelular está compuesto por células tabicadas, alargadas o no tabicadas (cenocíticas), llamadas hifas (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Es muy importante que los hongos para poder desarrollarse correctamente, tengan una fuente de carbono, la cual es un carbohidrato. Entre los carbohidratos más importantes se encuentran “la glucosa, sacarosa y maltosa; necesitan de nitrógeno (proteínas o sales de nitrógeno) y H₂O. Precisan también de iones inorgánicos más comunes, en especial como nutrientes mayores: potasio, fósforo y magnesio, y como nutrientes menores: hierro, cobre, zinc y molibdeno” (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Para el adecuado desarrollo, se debe de tener en cuenta también su temperatura óptima de crecimiento. A pesar de que la mayoría crecen entre los 20 y 30 °C, algunos crecen a otras temperaturas, clasificándose en: psicrófilos, que se desarrollan entre 0 y 20°C., mesófilos que crecen entre 0 a 50°C y termófilos que crecen a temperaturas más elevadas, entre 20 y 50°C (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Gran parte de los hongos, ya sean microscópicos o macroscópicos están formados por unas estructuras que le dan su forma, las cuales son elementos multicelulares y pertenecen a su unidad funcional. Estas se denominan hifas, las cuales constituyen al micelio (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.3.1. Clasificación de los hongos según su hifa o micelio

Según la función de las hifas se han dividido en los siguientes grupos:

3.3.1.1. Por su origen

Hifa verdadera: allí se incluyen a los hongos filamentosos los cuales se forman a partir de un conidio o espora.

Pseudohifas: estas son propias de las levaduras, las cuales se dan a partir de la gemación que se lleva a cabo a partir de una célula madre, ya que como bien se sabe, de una célula madre sale otra idéntica (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.3.1.2. Por su función

Micelio vegetativo: El micelio vegetativo es el encargado de absorber los nutrientes, de ahí el crecimiento que se puede observar en los diferentes agares, en este caso en el agar PDA. También es el encargado de proporcionar sostén y protección al hongo (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Micelio reproductivo: es el encargado de contener las esporas. Se produce cuando el hongo agota sus nutrientes o se encuentra en un estado de estrés. Es el

encargado de dar la forma de reproducción y crece hacia la superficie del medio (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.3.1.3 Por su morfología

Filamentosos: este es propio de los hongos mohos o filamentosos (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Unicelular: es más Característico de las levaduras (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.3.1.3. Por su diámetro

Micelio macrosifonado: “aquel que tiene un diámetro mayor a $1\mu\text{m}$; el cual lo presentan la mayor parte de los hongos filamentosos” (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Micelio microsifonado: es aún más pequeño que el micelio macrosifonado ya que tiene un diámetro menor a $1\mu\text{m}$. Es característicos de los actinomicetos (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.3.1.4. Por la ausencia o presencia de pigmentos

Micelio hialino: Es aquel que carece de pigmento. Es semejante al de los hongos hialohifomicetos (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Micelio pigmentado: Se caracteriza por poseer pigmento, sobre todo de tipo melánico, presente en los feohifomicetos u hongos dematiáceos o fuliginosos (Bonifaz-Trujillo, 2015).

3.4. Características de los géneros encontrados en la colección de la UCM

Las colonias de *Penicillium* en PDA usualmente crecen rápidamente, con colonias generalmente de color blancas en la periferia y verdosas en el centro. El conidióforo de esta especie puede surgir del sustrato, de las hifas aéreas, de las

hifas con postrado o de las hifas erguidas. Los conidióforos hialinos de pared lisa o rugosa, pueden ser simples o agrupados, los cuales consisten en una sola tira de conidios terminada en un espiral de fiálides. Los conidios se encuentran agrupados en cadenas largas y secas, divergentes o en columnas, globosas, elipsoidales, cilíndricas o fusiformes, hialinas o verdosas, constituidas por una parte basal cilíndrica y un cuello distintivo; las fiálides por lo general son en forma de matraz o lanceolada (Samson, 2000).

Las colonias de *Fusarium* en PDA usualmente crecen rápido, de color crema, amarillento, pardo, rosado, rojizo o violeta, con borde indefinido. El micelio aéreo algodonoso generalmente es abundante en aislamientos frescos. Los conidióforos se pueden encontrar ramificados en pústulas fangosas o formando masas fangosas continuas de esporas, estos pueden surgir del micelio aéreo o directamente de la superficie del agar. Tienen fiálides delgadas y cónicas, son cortos en algunas especies con una o varias aberturas fértiles. Algunas cepas producen macroconidios septados en forma de plátano y otras microconidios, estos pueden ser elipsoidales, ovoides, globosos, piriformes o citriforme (Samson, 2000).

Las colonias de *Cladosporium* en PDA son de crecimiento lento. En su mayoría presentan un color oliváceo a marrón negruzco o gris oliva, son aterciopeladas debido a la abundancia de conidios. Presenta hifas vegetativas, las cuales son rectas, no ramificadas o ramificadas solo en la región apical. Los conidióforos son geniculados y alargados; los conidios se encuentran distribuidos en cadenas, los conidios inferiores son a menudo grandes y septados y los superiores son elipsoidales, fusiformes, ovoides o globososos, en su mayoría estos se encuentran formados en grupos de 1-3 dentículos en el vértice del conidióforo (Samson, 2000).

4. Materiales y métodos

4.1 Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales

La Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales es una colección biológica constituida por cuatro sub-colecciones: Clínica, Agrícola, Industria y de Referencia, las cuales contienen microorganismos (Hongos, Levaduras, Bacterias) provenientes de muestras ambientales (desechos vegetales), de monocultivos (agrícola), de efluentes y desechos industriales (industria), y aislamientos provenientes de investigaciones en el área (clínica). La CMUCM está adscrita al Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial. Cada cepa tiene varias réplicas en la colección y se encuentran almacenadas en tubos Eppendorf, teniendo cada una como mínimo 4 y máximo 12 réplicas. De acuerdo con los inventarios, esta colección cuenta con aproximadamente 270 microorganismos, se encuentran distribuidos en la base de datos así:

Bacterias: 39 géneros y 73 especies

Hongos: 7 géneros y 9 especies

Levaduras: 3 géneros y 5 especies

De los 270 microorganismos que tiene la colección, 46 son hongos, por tanto, se realiza revisión de la información y cultivo de las cepas de hongos para verificar la información que se encuentra en la base de datos del grupo GIBI de la UCM. En este trabajo se abordaron específicamente los aislamientos conservados en el freezer a -80°C.

4.2 Método de cultivo

El medio de cultivo utilizado para realizar la siembra fue agar PDA. Los últimos tubos de cada lote almacenados en la colección a -80 °C, se descongelaron gradualmente en el Eppendorf ThermoMixer por 15 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se hicieron siembras por agotamiento, con el fin de

verificar la viabilidad de los aislamientos, así como si se encontraban o no en estado axénico. Se incubaron a 24°C por 3 días , y por 9 y 14 días para los hongos que no tuvieron crecimiento a los 3 días de incubación. Al cabo de cada periodo de incubación que confirmaba la viabilidad del aislamiento, se dejó que transcurriera el desarrollo del hongo en la incubadora hasta que ocurriera la esporulación, momento en el que se procedió al registro fotográfico de las colonias.

4.3 Montaje de placas

El montaje de las placas se realizó en la cámara de flujo laminar con el fin de evitar contaminación externa en los cultivos, para el montaje de estas se utilizó un asa de punta redonda previamente esterilizada. Se tomó una muestra de micelio y esporas de cada una de las colonias previamente cultivadas, y en un portaobjetos se distribuyó la muestra en forma circular sobre una gota de azul de lactofenol. Posteriormente se puso el cubreobjetos realizando un poco de presión para que la muestra quedara fijada correctamente y se secó el exceso de colorante con una toalla de papel. Se esperó a que los bordes del cubreobjetos estuvieran totalmente secos para poner esmalte transparente alrededor de este para la conservación de las placas. Los montajes fueron documentados a través de micrografías, tomadas con microscopio Nikon eclipse triocular con cámara de la Universidad de Caldas.

5. Resultados

5.1 Presencia y ausencia de aislamientos registrados en la base de datos.

Según los registros de la CMUCM, los aislamientos de hongos contenidos en el freezer -80°C son 46. De estos 46 aislamientos, se pudo constatar la existencia en el freezer de 14 aislamientos, correspondientes a la colección de agroindustria (AG) (Tabla 1.). La subcolección de AG reportaba 24 aislamientos, lo que consolida un faltante de 10 aislamientos (Figura 1). Todos los elementos incorporados en la colección de industria (IN), los cuales eran 20, no registraron existencias que pudieran ser evaluadas; así como en el caso de la colección de referencia (RF), que reportaba 2 registros, donde tampoco se encontró ningún aislamiento. Se registró un porcentaje de existencia del 30% con respecto a los registros depositados en las bases de datos. Se procedió con el análisis de viabilidad de los 14 aislamientos de AG de los cuales se constató su existencia.

Estos 14 aislamientos se distribuyen taxonómicamente de la siguiente manera: se cuenta con tres géneros: *Penicillium*, *Fusarium*, y *Cladosporium*. El género *Penicillium* cuenta con dos especies: *Penicillium brevicompactum* y *Penicillium olsonii*, así como también el género *Fusarium*: *Fusarium equiseti* y *Fusarium oxysporum*. El género *Cladosporium* por su parte, con una especie: *Cladosporium lignícola*. Se cuentan además dentro de los 14 aislamientos reactivados con dos cepas *unknown* (desconocidas), de las cuales se desconoce su identificación taxonómica.

A partir de lo registrado en el presente estudio, la CMUCM presenta actualmente 3 géneros, con 5 especies diferentes, los cuales se encuentran identificados; y dos cepas de hongos de los cuales se desconocen su género y especie. El género con una mayor diversidad, entendida esta como una mayor cantidad de especies y con mayor abundancia (número de accesiones), es *Penicillium*. (Tabla 1).

Tabla 1. Ausencia, presencia y tiempo de crecimiento de los microorganismos.

#	Base de Datos	Consecutivo	Proc Muestra (AG,IN ó CL)	Identificación Molecular (16S) (Resumen)	Código único BD	Tiempo de crecimiento ¹
1	GIBI	_000054	IN	<i>Penicillium sp.</i>	GIBI_000054_IN_F	NR
2	GIBI	_000055	IN	<i>Beauveria bassiana</i>	GIBI_000055_IN_F	NR
3	GIBI	_000056	IN	<i>Aspergillus niger</i>	GIBI_000056_IN_F	NR
4	GIBI	_000057	IN	<i>Trichoderma sp.</i>	GIBI_000057_IN_F	NR
5	GIBI	_000058	IN	<i>Aspergillus versicolor</i>	GIBI_000058_IN_F	NR
6	GIBI	_000059	IN	<i>Cladosporium sp.</i>	GIBI_000059_IN_F	NR
7	GIBI	_000060	IN	<i>Geotrichum sp.</i>	GIBI_000060_IN_F	NR
8	GIBI	_000061	IN	<i>Chaetomium sp.</i>	GIBI_000061_IN_F	NR
9	GIBI	_000062	IN	<i>Phytophthora sp.</i>	GIBI_000062_IN_F	NR
10	GIBI	_000077	IN	<i>Aspergillus niger</i>	GIBI_000077_IN_F	NR
11	GIBI	_000078	IN	<i>Trichoderma sp.</i>	GIBI_000078_IN_F	NR
12	GIBI	_000079	IN	<i>Geotrichum sp.</i>	GIBI_000079_IN_F	NR
13	GIBI	_000080	IN	<i>Cladosporium sp.</i>	GIBI_000080_IN_F	NR
14	GIBI	_000081	IN	<i>Aspergillus nidulans</i>	GIBI_000081_IN_F	NR
15	GIBI	_000082	IN	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GIBI_000082_IN_F	NR
16	GIBI	_000083	IN	<i>Penicillium sp.</i>	GIBI_000083_IN_F	NR
17	GIBI	_000084	IN	<i>Beauveria bassiana</i>	GIBI_000084_IN_F	NR
18	GIBI	_000085	IN	<i>Verticillium sp.</i>	GIBI_000085_IN_F	NR
19	GIBI	_000086	IN	<i>Phytophthora sp.</i>	GIBI_000086_IN_F	NR
20	GIBI	_000087	IN	<i>Scopulariopsis sp.</i>	GIBI_000087_IN_F	NR

¹ NR: No registrados en el freezer -80°C al momento de la reactivación.

#	Base de Datos	Consecutivo	Proc Muestra (AG,IN ó CL)	Identificación Molecular (16S) (Resumen)	Código único BD	Tiempo de crecimiento ²
21	GIBI	_000088	AG	<i>Aspergillus niger</i>	GIBI_000088_AG_F	NR
22	GIBI	_000089	AG	<i>Aspergillus flavus</i>	GIBI_000089_AG_F	NR
23	GIBI	_000113	AG	<i>Candida kruzei</i>	GIBI_000113_AG_Y	NR
24	GIBI	_000114	AG	<i>Trichoderma sp.</i>	GIBI_000114_AG_F	NR
25	GIBI	_000115	AG	<i>Geotrichum sp.</i>	GIBI_000115_AG_F	NR
26	GIBI	_000213	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000213_AG_F	NR
27	GIBI	_000214	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000214_AG_F	NR
28	GIBI	_000215	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000215_AG_F	3 días
29	GIBI	_000216	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000216_AG_F	9 días
30	GIBI	_000217	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000217_AG_F	3 días
31	GIBI	_000218	AG	<i>Cladosporium lignicola</i>	GIBI_000218_AG_F	14 días
32	GIBI	_000219	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000219_AG_F	NR
33	GIBI	_000220	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000220_AG_F	NR
34	GIBI	_000221	AG	<i>Fusarium equiseti</i>	GIBI_000221_AG_F	14 días
35	GIBI	_000222	AG	<i>Penicillium olsonii</i>	GIBI_000222_AG_F	3 días
36	GIBI	_000223	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000223_AG_F	NR
37	GIBI	_000224	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000224_AG_F	3 días
38	GIBI	_000225	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000225_AG_F	3 días
39	GIBI	_000226	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000226_AG_F	3 días
40	GIBI	_000227	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000227_AG_F	3 días
41	GIBI	_000228	AG	<i>Penicillium brevicompactum</i>	GIBI_000228_AG_F	9 días

² NR: No registrados en el freezer -80°C al momento de la reactivación.

#	Base de Datos	Consecutivo	Proc Muestra (AG,IN ó CL)	Identificación Molecular (16S) (Resumen)	Código único BD	Tiempo de crecimiento ³
42	GIBI	_000232	RF	<i>Trichophyton tonsurans</i>	GIBI_000232_RF_F	NR
43	GIBI	_000242	RF	<i>Microsporum canis</i>	GIBI_000242_RF_F	NR
44	GIBI	_000354	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000354 AG F	9 días
45	GIBI	_000355	AG	<i>Unknown</i>	GIBI_000355 AG F	3 días
46	GIBI	_000356	AG	<i>Fusarium oxysporum</i>	GIBI_000356 AG F	3 días

³ NR: No registrados en el freezer -80°C al momento de la reactivación.

En la Tabla 1 se muestran las cepas que durante el estudio fueron encontradas, además de las registradas en las bases de datos pero que no presentan existencias físicas en la CMUCM, específicamente las de los hongos. Se presenta también el tiempo de crecimiento de cada los aislamientos cuya existencia fue constatada, los cuales como ya fue mencionado solo pertenecen a la subcolección AG. De las 14 cepas, nueve crecieron en un lapso de 3 días, tres en un lapso de 9 días y dos en un lapso de 14 días.

Las que crecieron en un lapso de tres días fueron seis cepas de *Penicillium brevicompactum*, una cepa de *Penicillium olsonii*, *unknown* y *Fusarium oxysporum*. Los códigos de éstas son GIBI_000215, GIBI_000217, GIBI_000224, GIBI_000225, GIBI_000226, GIBI_000227, GIBI_000222, GIBI_000355 y GIBI_000356 respectivamente.

Las que crecieron en un lapso de 9 días fueron dos cepas de *Penicillium brevicompactum*, y una cepa *unknown*. Los códigos de éstas son GIBI_000216, GIBI_000228 y GIBI_000354 respectivamente.

Las que crecieron en un lapso de 14 días fue una cepa de *Cladosporium lignícola* y una de *Fusarium equiseti*. Estas cepas crecieron en este periodo de tiempo pero no presentaron esporulación; por lo tanto se dejaron en incubación por siete días más con el fin de obtenerla. Se completaron 21 días en total de la incubación de estas cepas desde el día de siembra y no se obtuvo los resultados esperados, ya que solo se obtuvo el crecimiento más no su fase de reproducción. Los códigos de éstas son GIBI_000218 y GIBI_000221 respectivamente.

5.2 Porcentaje de presencia, viabilidad y pureza de las cepas de hongos de la colección de la UCM.

De acuerdo a la revisión cualitativa (presencia- ausencia) y comparación de las cepas encontradas en el freezer de la colección de la UCM con la base de datos,

se obtuvieron los resultados cuantitativos (porcentajes). Puede observarse que las cepas de la sub- colección de referencia (RF) al igual que las de industria (IN) se encuentran ausentes en su totalidad, pues el porcentaje de presencia fue del 0%. Las cepas de la subcolección de agroindustria (AG), tienen un porcentaje de presencia de 58%, ya que, de las 24 cepas registradas en este grupo, están presentes 14 de ellas (Figura 1).

Los porcentajes de viabilidad y pureza fueron del 100%. La viabilidad de todas las cepas se evidenció ya que todas presentaron crecimiento en agar PDA, con más de una unidad formadora de colonia (UFC). La pureza, se evidenció al observar el desarrollo de las colonias características de las cepas estudio, sin presencia de microorganismos no esperados; es decir, ausencia total de contaminantes.

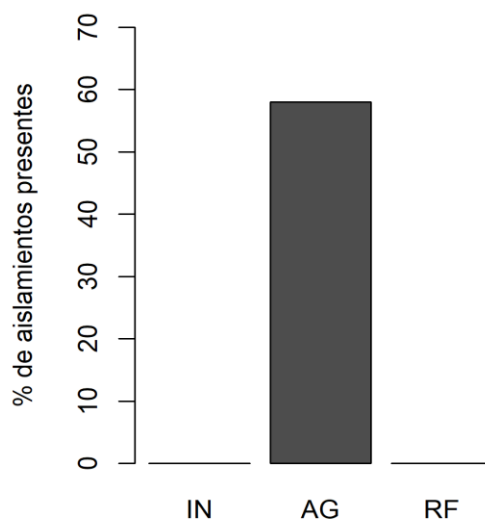


Figura 1. Porcentaje de aislamientos presentes en el freezer -80°C de cada subcolección.

Las 14 cepas encontradas y sembradas, se encuentran distribuidas dentro de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y las cepas *unknown*, las cuales son de género y especie desconocida. Dentro de la colección, *Penicillium*

brevocompactum presenta 8 cepas; *Penicillium olsonii*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Cladosporium lignícola* por su parte, presentan 1 cepa y se encuentran 2 cepas de identificación taxonómica desconocida (*unknown*), (Tabla 2). A partir de los resultados estipulados en la Tabla 2, *Penicillium brevicompactum* es el hongo que más prevalece dentro de las cepas presentes en el freezer -80°C, con un total de 8 cepas como se nombró anteriormente; pertenecientes a la subcolección AG.

La tabla 2, muestra también los códigos de las 14 cepas de la subcolección AG, proporcionando un orden a la colección; ya que permiten una identificación de ellas en la base de datos de la CMUCM y una ubicación rápida y eficaz en el freezer -80°C. Las cepas de hongos aisladas se encuentran distribuidas entre el código GIBI_000215_AG_F y el GIBI_000356 AG F.

Tabla 2. Cantidad de asilamiento y código de la base de datos por cada género y especie aislado.

GÉNERO Y ESPECIE	CANTIDAD DE ASILAMIENTOS	CÓDIGOS
<i>Penicillium brevicompactum</i>	8	GIBI_000215_AG_F, GIBI_000216_AG_F, GIBI_000219_AG_F, GIBI_000224_AG_F, GIBI_000225_AG_F, GIBI_000226_AG_F, GIBI_000227_AG_F, GIBI_000228_AG_F
<i>Penicillium olsonii</i>	1	GIBI_000222_AG_F
<i>Fusarium equiseti</i>	1	GIBI_000221_AG_F
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	GIBI_000356 AG F
<i>Cladosporium lignicola</i>	1	GIBI_000218_AG_F
<i>Unknown</i>	2	GIBI_000354 AG F, GIBI_000355 AG F

5.3 Observación macroscópica y microscópica.

Después de sembrar, montar y observar cada cepa; se obtuvieron los resultados esperados, ya que las colonias concordaron con las características morfológicas de las especies reportadas para cada uno de los aislamientos. Según la literatura, obtenida de la base de datos MYCOBANK , el libro de micología

médica básica y del libro de Introducción a los Hongos Alimentarios, se debían de presentar ciertas características que solamente el microorganismo aislado debía de presentar, ya que son únicas y permiten la diferenciación entre ellos.

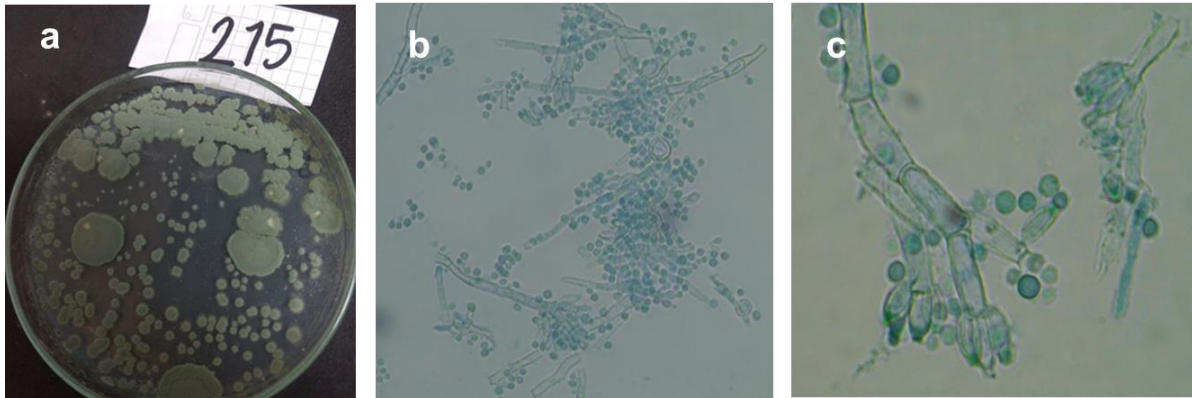


Figura 2. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000215) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

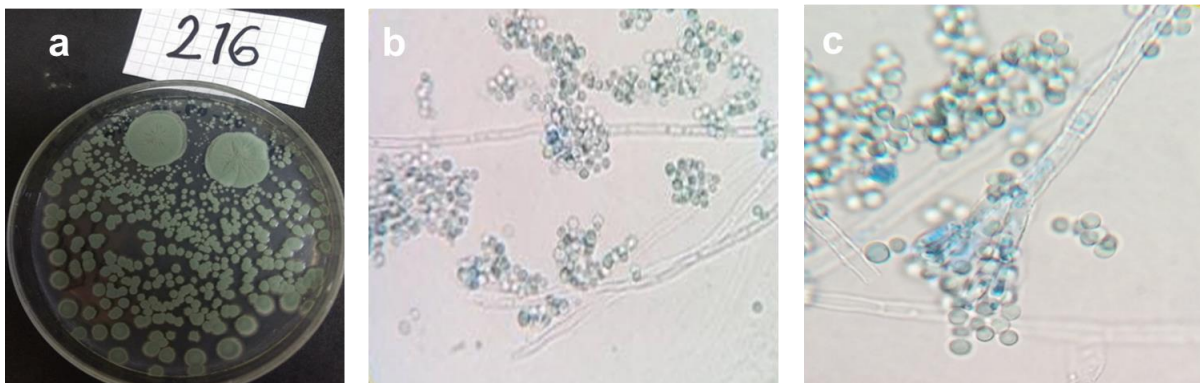


Figura 3. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000216) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

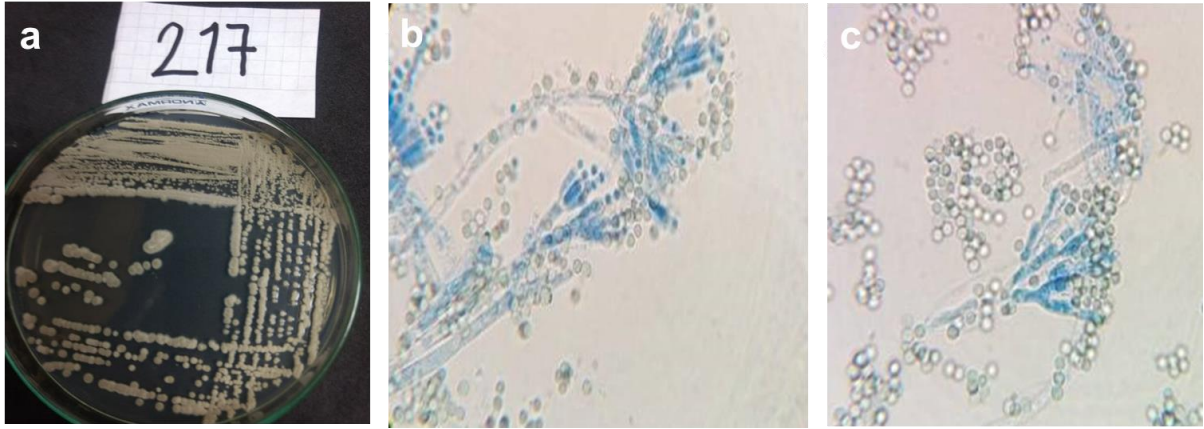


Figura 4. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000217) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

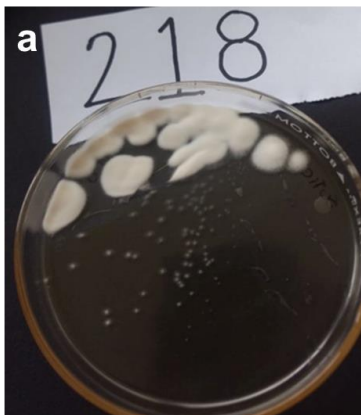


Figura 5. *Cladosporium lignicola* (GIBI_000218) a) Vista superior macroscópica.

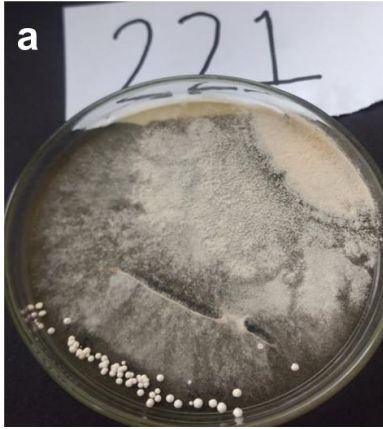


Figura 6. *Fusarium equiseti* (GIBI_000221) a) Vista superior macroscópica.

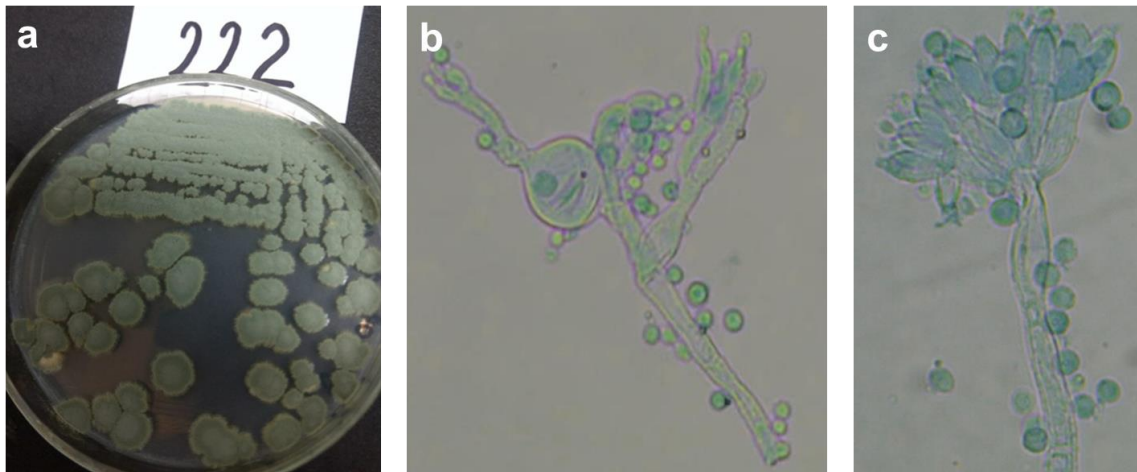


Figura 7. *Penicillium olsonii* (GIBI_000222) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

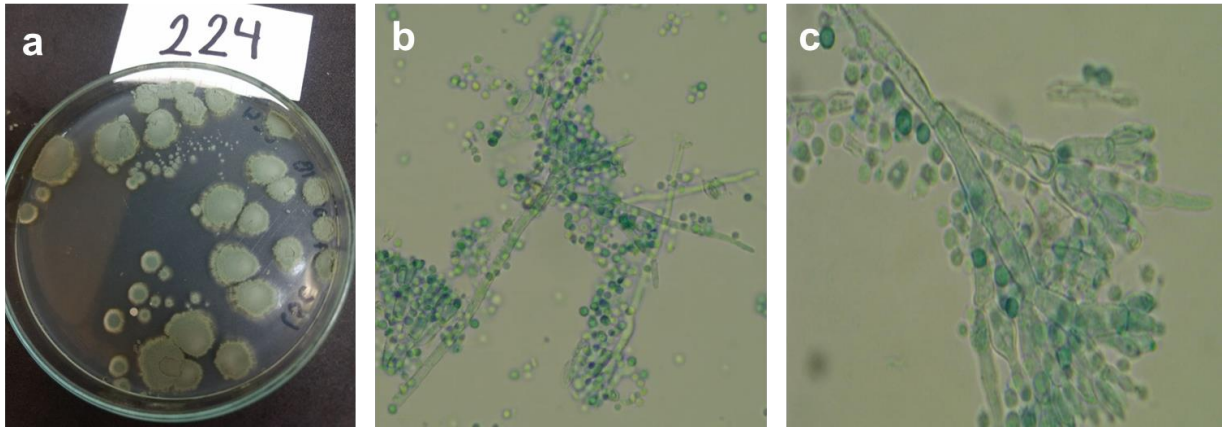


Figura 8. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000224) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

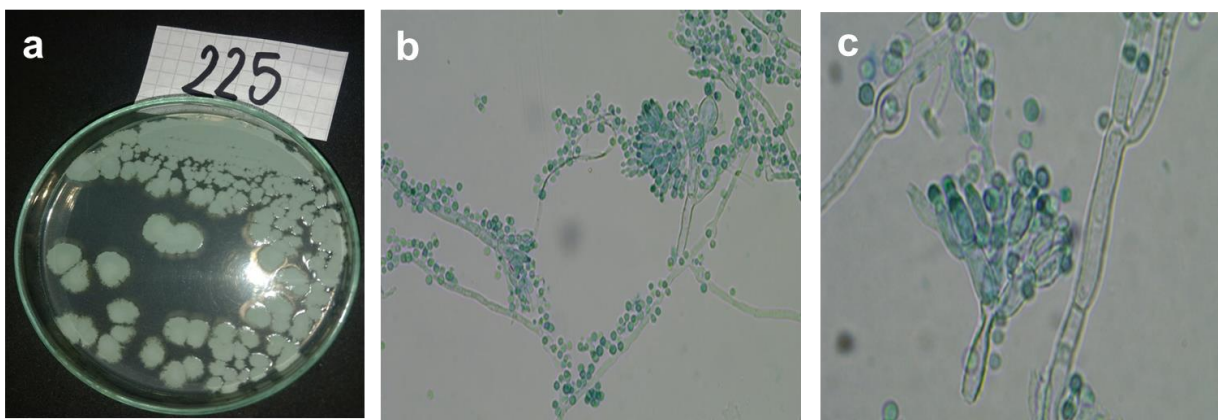


Figura 9. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000225) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

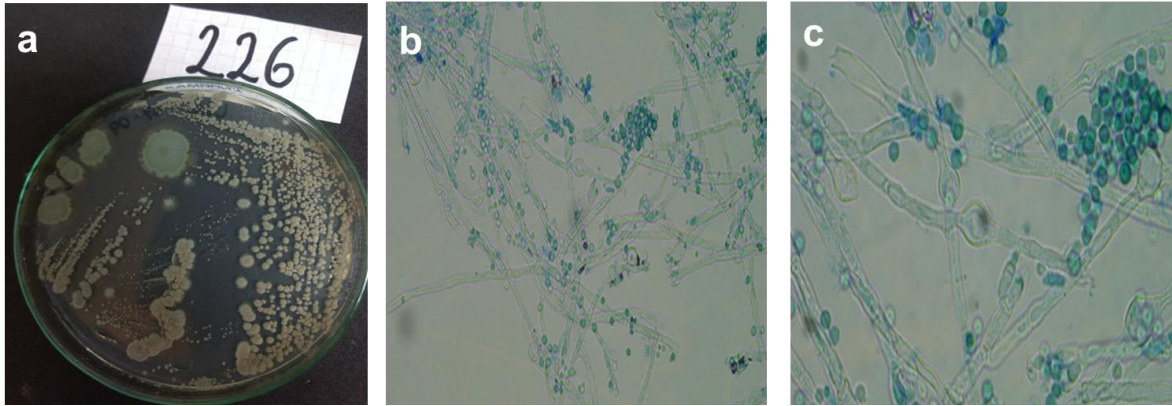


Figura 10. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000226) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

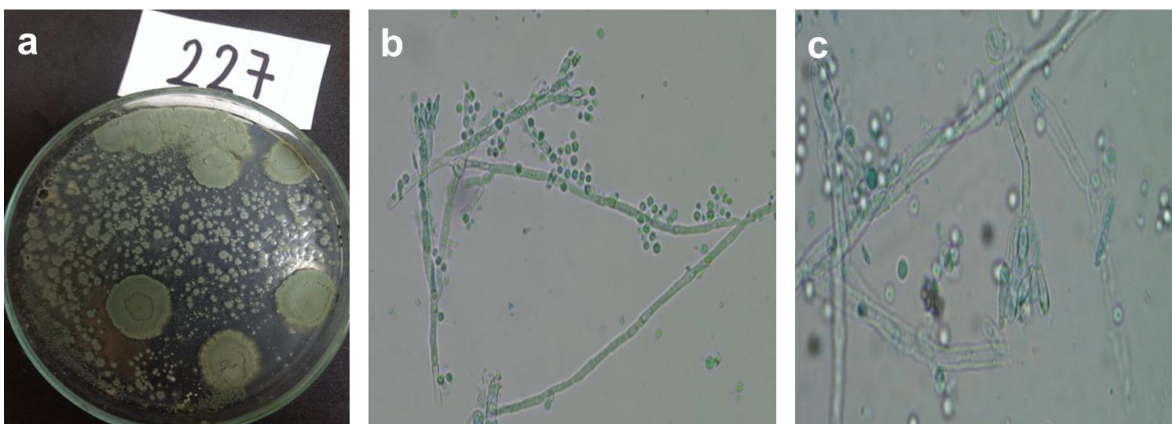


Figura 11. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000227) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

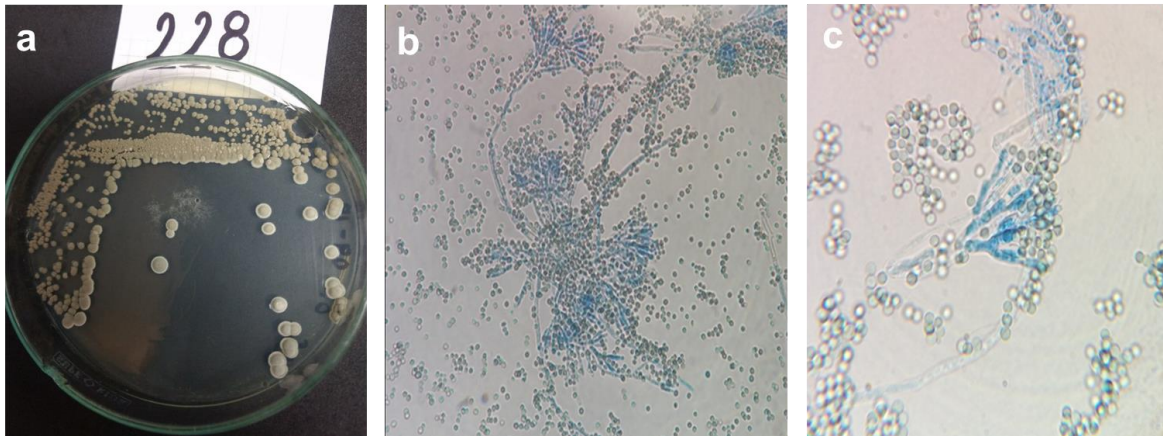


Figura 12. *Penicillium brevicompactum* (GIBI_000228) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

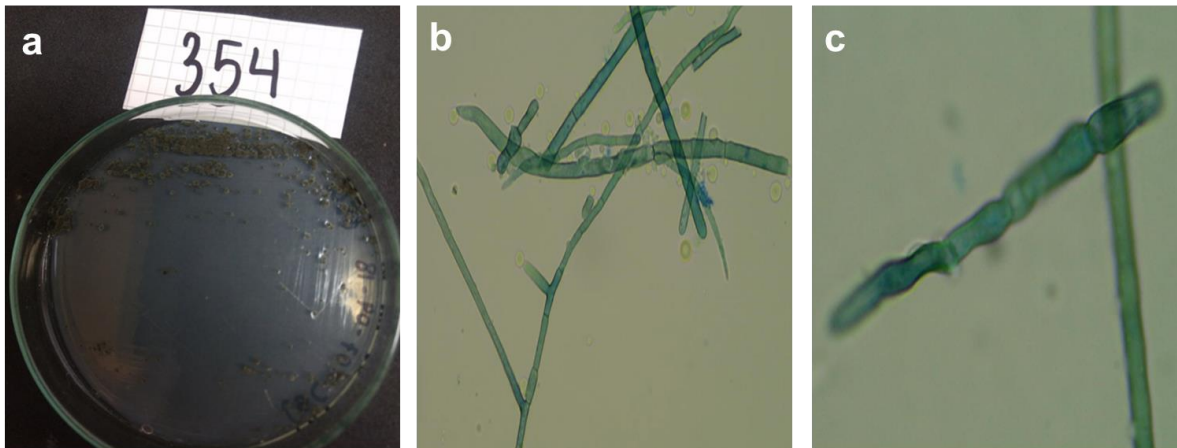


Figura 13. *Unknown* (GIBI_000354) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

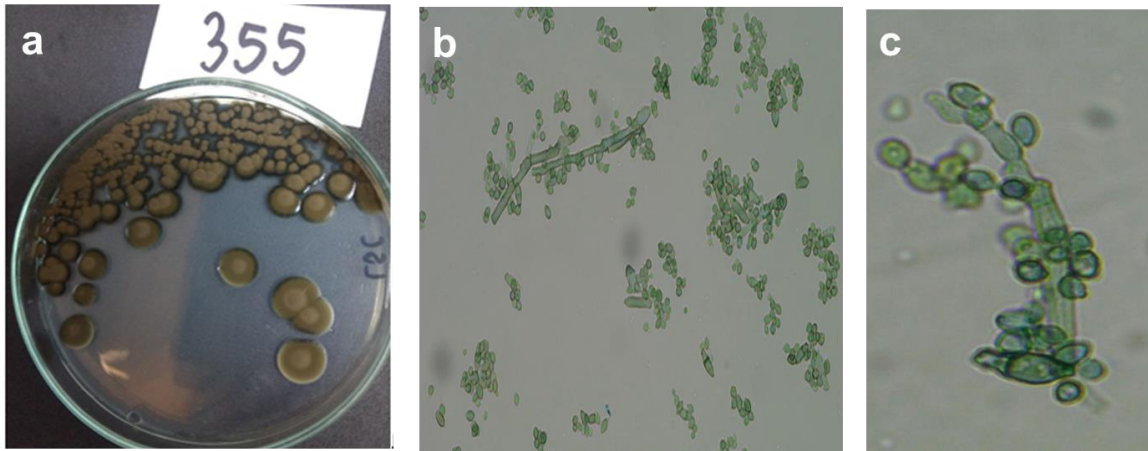


Figura 14. *Unknown* (GIBI_000355) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

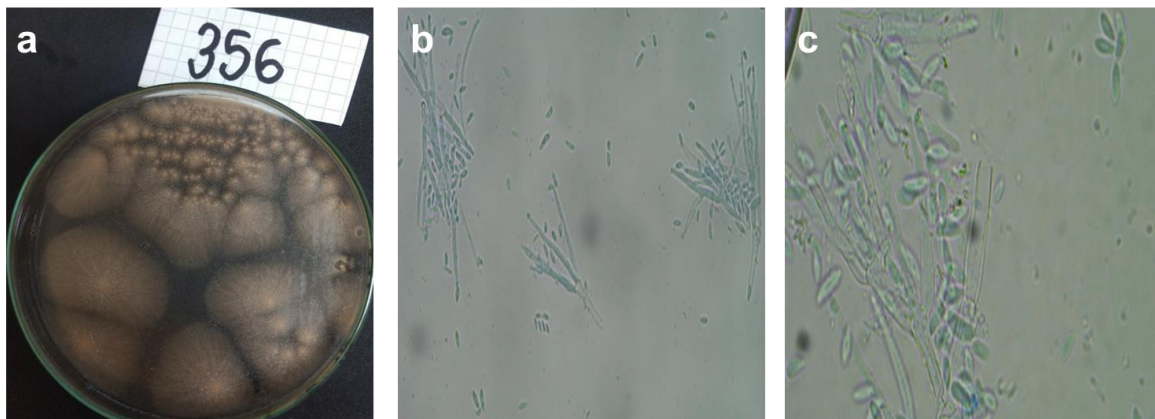


Figura 15. *Fusarium oxysporum* (GIBI_000356) a) Vista superior macroscópica, b) observación microscópica 40x, c) observación microscópica 100x.

Las figuras 2 a 15 muestran el reporte de la caracterización morfológica macro y microscópica realizada a los aislamientos evaluados. Al observar el crecimiento de las cepas (características macroscópicas) se pudo determinar si se encontraban en condiciones favorables, para así poder observar la morfología correcta a la hora de realizar la placa con su respectiva tinción. De las 14 cepas aisladas, 12 de ellas esporularon, los dos restantes, *Cladosporium lignicola* y *Fusarium equiseti* crecieron pero no esporularon, por lo tanto, la tinción con azul de lactofenol se le

realizó sólo a las 12 cepas que presentaron la condición nombrada anteriormente; pues sólo si la presentan, se pueden identificar sus características macroscópicas y microscópicas.

Según el soporte taxonómico obtenido de la literatura nombrada anteriormente, los hongos analizados cumplen con las características tanto macroscópicas como microscópicas; las cuales se encuentran descritas en el marco teórico de cada género asilado. Los soportes taxonómicos aseguran un resultado confiable y eficaz a la hora de observar las características de cada cepa.

A partir de lo observado en las imágenes anteriores, se pudo determinar que no hubo contaminación presente, ya que no se evidenció crecimiento de algún microorganismo diferente al identificado y estipulado en la colección; lo cual es una gran ventaja ya que nos permitió obtener unas fotografías de calidad, pues de no haber obtenido cultivos puros, se hubieran presentado interferencias en los resultados.

6. Discusión

A partir de las 14 cepas estudiadas, se pudo determinar que 12 de ellas (las que esporularon) coinciden con la identificación taxonómica que se tiene de ellas en la base de datos de la colección de la UCM, las dos restantes, se encuentran viables y puras, pero al no obtener un crecimiento total de ellas, es decir, sus estructuras reproductivas, no se pudieron corroborar sus identidades taxonómicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos reflejados en la gráfica de porcentajes de presencia- ausencia, viabilidad y pureza, la subcolección de IN (industria) tiene una ausencia total de las cepas de hongos y la de AG (agroindustria) tiene presentes 14 cepas de las 24 que están adscritas en la base de datos. Por lo tanto, este es un aspecto muy importante a tener en cuenta en el momento de la actualización de la información de la base de datos. Se debe resaltar que la colección por el momento no cuenta con las cepas de referencia de hongos, lo cual debe ser revisado y tenido en cuenta para mantener un control de los microorganismos preservados para de esta manera brindar cepas de calidad.

El porcentaje de viabilidad y pureza demuestran que las cepas presentes de la subcolección de (AG) cumplen con estos parámetros en su totalidad. La viabilidad se evidenció a partir de los aislamientos realizados ya que todas tuvieron la capacidad de crecer en el medio PDA en un curso de 3 a 14 días. En 12 de las 14 cepas asiladas, se pudieron evaluar sus características propias, como lo son: color, forma, aspecto, borde; por lo tanto, se puede decir que se realizó una buena preparación del inóculo inicial, lo que permitió que se preservaran las características fenotípicas. Para evaluar la conservación genotípica se deben de hacer otro tipo de pruebas, igualmente para las características bioquímicas.

Las cepas que demoraron 9 días para su crecimiento, según un estudio realizado por (García-Martínez, López-Lacomba, & Castaño-Pascual, 2018) pudo deberse a la necesidad de ajuste de los microorganismos a las nuevas

condiciones medioambientales, lo que quiere decir que éstas que se demoraron más días en crecer, no son menos viables que las que crecieron en tres días. Las cepas que demoraron más de los nueve días en crecer pudo deberse por la condición nombrada anteriormente o porque en el caso de *Cladosporium*, es un hongo que se demora más días en desarrollarse.

En el caso de *Cladosporium lignicola* y *Fusarium equiseti*, que crecieron pero no esporularon, según (De Andrade Mota, Kanadani Campos, & Araujo, 2003) pudo ser causa de un poco tiempo de esporulación del aislamiento inicial, antes de ser preservadas las cepas en criopreservación, ya que, al tener un buen tiempo de esporulación, hay un aumento en la cantidad de material fúngico conservado, por lo que el material recuperado en los aislamientos posteriores va a ser significativo.

La pureza se determinó también con los cultivos, ya que ninguno de ellos presentó algún tipo de crecimiento de un microorganismo no esperado, lo que indica que todos se encuentran puros, sin ningún tipo de contaminación. Las cepas de la colección se encuentran estables, lo que se pudo determinar con las características macroscópicas y microscópicas a partir de los cultivos, pues los resultados fueron comparados con claves taxonómicas y lo observado corresponde a lo propio de cada género estudiado. Al comprobar que todos ellos se encuentran viables, puros y estables, se puede verificar que el método de preservación empleado para la CMUCM que es la criopreservación (-80°C) es el adecuado y se puede seguir utilizando para tal fin.

Las cepas de la UCM tienen como criopreservador caldo PD con 10% de glicerol, según (Ladino-Rey, Rubio, & Chacin-Zambrano, 2016), el uso del glicerol para la criopreservación de hongos filamentosos, permite tener como efecto un recubrimiento de las células, impidiendo la lisis o cambios osmóticos debido a la disminución de la temperatura en la suspensión. Además de esto, a temperaturas tan bajas no crece ningún tipo de microorganismo, lo que evita la contaminación y certifica la pureza de la colección mientras esta sea manipulada correctamente. Es

importante destacar que el método utilizado (criopreservación) es muy eficiente a largo plazo, ya que su costo no es tan elevado, pues es más fácil obtener glicerol y refrigeradores que congelen a temperaturas entre -50°C y -80°C que refrigeradores que congelen a -196°C para la conservación con nitrógeno líquido.

En un análisis realizado por (Arencibia-Arrebola, Rosario-Fernández, & Gómez Menéndez, 2014), la criopreservación ultrafría (-50°C y -80°C), también tiene sus desventajas, entre estas que para un control de calidad de la colección se debe de hacer una siembra periódica para observar las características macroscópicas y microscópicas de las cepas, lo que podría generar una contaminación que no se había obtenido en el transcurso de la conservación.

Según lo dicho por (Hernandez, 2003), las resiembras no se tendrían que realizar si se utilizara el método de congelación con nitrógeno líquido, por lo que el metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C ; y su viabilidad se mantiene por muchos años. Al no realizar siembras periódicas se reducen al mínimo los riesgos de contaminación, cambios genéticos y bioquímicos del microorganismo, teniendo como desventaja el alto costo requerido y se requiere de un suministro constante de nitrógeno, además de las fallas mecánicas y eléctricas que pueden afectar la colección; sin embargo si se quisiera disminuir al máximo la contaminación, se espera conservar la colección por mucho tiempo y no se cuenta con personal idóneo para el repique y revisión periódica de las cepas, este método sería una opción para tener en cuenta.

7. Conclusión

Se realizó el estudio del estado actual de la colección de hongos de la UCM, teniendo en cuenta los aspectos de presencia- ausencia, viabilidad y pureza.

Los registros que se tienen de la colección deben ser revisados y actualizados, pudiéndose también, si se requiere y se tienen los recursos suficientes, completar la colección; ya que los resultados de presencia- ausencia arrojaron que varias de las cepas de hongos no se encuentran presentes.

Los resultados obtenidos arrojaron unos porcentajes que demuestran que se encuentra en adecuadas condiciones, en cuanto a su viabilidad y pureza, pues en las cepas encontradas estos aspectos obtuvieron un 100%, por ende, el método de conservación (criopreservación) con 10% de glicerol, ha sido el adecuado y se puede seguir utilizando.

8. Bibliografía

1. Arencibia-Arrebola, D. F., Rosario-Fernández, L. A., & Gómez Menéndez, R. (2014). *Métodos generales de conservación de microorganismos*.
2. Bonifaz-Trujillo, A. (2015). *Micología médica básica (5a. ed.)*.
3. De Andrade Mota, M., Kanadani Campos, A., & Araujo, J. V. (2003). Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasium* submitted to different methods of preservation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *34*, 157–160.
4. Díaz, J., González, A., & Soacha-Godoy, K. (2015). *Guía de registro y actualización de colecciones biológicas*. Retrieved from <http://rnc.humboldt.org.co/wp/wp-content/uploads/2016/03/InstructivoRNC2.0.2.pdf>
5. Garcia-Martínez, J., López-Lacomba, D., & Castaño-Pascual, Á. (2018). Evaluation of a Method for Long-Term Cryopreservation of Fungal Strains. *Biopreservation and Biobanking*, *16*(2), 129–137.
6. González-González, M. I. (2008). Materiales y cepas de referencia en laboratorios de Microbiología Ambiental. *INHEM*, 1–15.
7. Hernandez, A. (2003). *Microbiología Industrial*.
8. IAvH. (2015). *Protocolo para el depósito de especímenes: Colecciones de especímenes y de sonidos ambientales IAvH*.
9. Ladino-Rey, O. E., Rubio, J. D., & Chacin-Zambrano, C. A. (2016). Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. *Centro Agrícola*, *43*(2), 36–41. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000200005
10. Llorente-Bousquets, J., Koleff-Osorio, P., Benitez-Diaz, H., & Morales, L. L. (1999). *Sintesis del estado de las colecciones biológicas mexicanas*. <https://doi.org/10.1002/kin.550101103>
11. Palacio, A., Gutiérrez, Y., Rojas, D., Atehortúa, L., & Zapata, P. (2014). Viability of Basidiomycete fungal strains under different conservation methods:

cryopreservation vs. freeze-drying processes. *Actualidades Biológicas*, 36(100), 13–21. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842014000100002

- 12 .Pegg, D. E. (2007). Principles of Cryopreservation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 368, pp. 39–57).
13. Samson, R. A. (2000). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*.
14. Uzunova, T., & Donevs, T. (2005). Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections*, 4(1), 17–28.
15. World Federation for Culture Collections. (2010). *Establecimiento Y Funcionamiento De*.