

**ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE *Aspergillus brasiliensis* PARA SU  
USO EN PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD Y VALIDACIÓN DE  
ANÁLISIS DE MOHOS EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE  
BARRANQUILLA**

**JENNY MABET TRIANA ARRIETA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
2016**

**ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE *Aspergillus brasiliensis* PARA SU  
USO EN PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD Y VALIDACIÓN DE  
ANÁLISIS DE MOHOS EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE  
BARRANQUILLA**

**JENNY MABET TRIANA ARRIETA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**MICROBIÓLOGA**

**DIRIGIDO**

**POR:**

**RAMONVIDIO GARCÍA RICO**

**COORDIRIGIDO**

**POR: VIRGINIA ELENA CÁRDENAS BARRIOS**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA MICROBIOLOGÍA**

**PAMPLONA**

**2016**

**ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE *Aspergillus brasiliensis* PARA SU  
USO EN PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD Y VALIDACIÓN DE  
ANÁLISIS DE MOHOS EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE  
BARRANQUILLA.**

**JENNY MABET TRIANA ARRIETA**

**APROBADO POR**

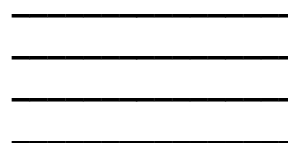
---

**Firma 1° Jurado**

---

**Firma 2° Jurado**

## NOTA DE ACEPTACIÓN



**Pamplona. 2016**

## TABLA DE CONTENIDO

1	OBJETIVOS .....	13
1.1	OBJETIVO GENERAL .....	13
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
2	JUSTIFICACIÓN .....	14
3	MARCO REFERENCIAL.....	17
3.1	BASES LEGALES.....	17
3.2	ANTECEDENTES.....	18
3.3	SISTEMA TEÓRICO.....	20
3.3.1	Generalidades sobre las cepas de trabajo en un laboratorio de Microbiología .....	20
3.3.1.1	Definiciones de material microbiológico .....	20
3.3.1.2	Utilidad de las Cepas de Trabajo .....	20
3.3.2	Validación de los métodos .....	21
3.3.2.1	Métodos normalizados .....	21
3.3.2.2	Métodos Modificados.....	22
3.3.2.3	Métodos Alternativos.....	22
3.3.2.4	Protocolo de validación.....	22
3.3.2.5	Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas.....	23
3.3.3	Generalidades de hongos filamentosos .....	24
3.3.3.1	Factores que afectan el crecimiento de los hongos filamentosos.....	26
3.3.3.2	Importancia de los mohos y sus análisis en los alimentos.....	26
3.3.3.3	Género <i>Aspergillus</i> .....	27
3.3.3.4	<i>Aspergillus</i> Sección <i>Nigri</i> .....	31
3.3.3.5	<i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	33
3.3.4	Medida del crecimiento de Microorganismos.....	34
3.3.4.1	Recuento de esporas de hongos por conteo directo al Microscopio en Cámara de Neubauer .....	35
4	METODOLOGÍA.....	37
4.1	Trazabilidad de cepas (material de referencia) .....	37
4.1.1	Cepa de Referencia .....	37
4.2	Materiales y reactivos.....	37
4.3	Equipos e instrumentos utilizados.....	38
4.4	Control de ambientes de las cabinas de flujo laminar .....	39
4.5	Reactivación de <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	39
4.5.1	Uso de los Dispositivos KWIK-STIK™ .....	40
4.6	Concentración de esporas.....	40
4.6.1	Ajuste del Inóculo .....	40

4.6.2	Preparación de la Solución de Recolección de esporas ..	40
4.6.3	Conteo en Cámara de Neubauer .....	41
4.6.3.1	Cálculo de la medida de la concentración .....	41
4.6.3.2	Ajuste de Inóculo .....	42
4.7	Recuento en placa .....	42
4.8	Viabilidad.....	42
4.9	Pureza.....	44
4.9.1	Caracterización microscópica .....	44
4.9.2	Caracterización macroscópica .....	44
4.10	Parámetros estadísticos basados en la guía técnica colombiana gtc 84 (modelos matemáticos de variación). <sup>28</sup> .....	44
4.11	Porcentaje de Recuperación de las Esporas de <i>A. brasiliensis</i> .....	45
5	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	46
6	RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	47
6.1	Control de ambiente de la cabina de Flujo laminar .....	47
6.2	Reactivación de <i>A. brasiliensis</i> .....	47
6.3	Concentración de esporas.....	50
6.3.1	Conteo en Cámara de Neubauer y Ajuste del Inóculo de <i>Aspergillus brasiliensis</i> . .....	50
6.4	Recuento en placa .....	53
6.5	Pureza.....	56
6.5.1	Caracterización microscópica .....	56
6.5.2	Caracterización macroscópica .....	59
6.6	Evaluación estadística .....	60
6.7	Correlación entre el Recuento de esporas por cámara de Neubauer y Recuento en placa.....	62
7	CONCLUSIONES.....	65
8	SUGERENCIAS .....	66
9	BIBLIOGRAFÍA.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<p><b>Figura 3-1. Estructuras de reproducción asexual de <i>Aspergillus sp.</i> Cabeza aspergilar donde se observa el conidióforo, vesículas, fiálides y cadenas de fialoconidios, estructuras que intervienen en la reproducción asexual de los hongos de este género.</b> <sup>34</sup> .....</p>	29
<p><b>Figura 3-2. a. Morfología de <i>A. fumigatus</i>. Colonia plana, de aspecto aterciopelado, de color verde olivo y en la periferia con un halo claro. b. El estudio microscópico teñido con azul de algodón permite visualizar cabezas aspergilaras con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula, las conidios son incoloras y miden 2 a 3 µm. Dr. LJ Méndez Tovar.</b> <sup>34</sup> .....</p>	29
<p><b>Figura 3-3. a. <i>Aspergillus flavus</i>. El primoaislamiento (izquierda) generalmente es verde amarillento; b. en resiembras de cultivos puede adquirir un color beige o amarillento (centro); c. El estudio microscópico muestra fiálides dispuestas en toda la superficie de la vesícula del conidióforo. Dr. LJ Méndez Tovar.</b> <sup>34</sup> .....</p>	30
<p><b>Figura 3-4. a. Aunque el nombre <i>A. niger</i> sugiere color negro por el aspecto macroscópico de las colonias, las hifas son incoloras (hialinas). El color negro se debe a los conidios en la superficie del cultivo que son oscuras y cuyo diámetro puede ser hasta de 4 µm. b. La vesícula está rodeada de fiálides por lo que los contornos de la misma no se pueden observar, este color de conidios y la disposición de las fiálides en los 360° son característicos de esta especie.</b> <sup>34</sup> .....</p>	31
<p><b>Figura 3-5. a. Morfología microscópica a partir de cultivo de <i>Aspergillus glaucus</i>. Azul de lactofenol, 40x. Descripción: cabezuelas esparcidas y radiadas, uniseriadas. Vesículas esféricas. Conidióforos hialinos de pared delgada. Conidias ovales o equinuladas, hialinas. b. Cultivo de <i>Aspergillus glaucus</i>. Agar Sabouraud. Descripción: colonias difusas, planas de color verde, café o gris.</b> <sup>53</sup> .....</p>	31
<p><b>Figura 3-6. Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> sp. nov. CBS 101740T. (a). Colonias en CYA; (b). colonias sobre OA; (c). colonias sobre MEA; (d-g). conidióforos; (h). conidios bajo microscopio de luz; (i). conidios como se ve usando SEM. Barras de 10 mm (d-h) y 5 mm (i).</b> <sup>56</sup> .....</p>	34
<p><b>Figura 4-1. Diagrama de flujo del procedimiento para hallar viabilidad de <i>A. brasiliensis</i>.</b> .....</p>	43
<p><b>Figura 6-1.a. Crecimiento de <i>A. brasiliensis</i> en Agar–dextrosa 4% Sabouraud a pH 5.0 (A lado izquierdo) y 5.6 (A lado derecho). b. Crecimiento de <i>A.</i></b></p>	

<i>brasiliensis</i> en Agar YGC a pH 5.0 (A lado izquierdo) y 6.6. (A lado derecho). c. Crecimiento de <i>A. brasiliensis</i> en Agar PDA a pH 3.5 d. Observación microscópica con objetivo de 40X en cámara de Neubauer de esporas de <i>A. brasiliensis</i> de una solución realizada a partir de crecimiento del hongo en Agar– Papa Dextrosa.....	49
Figura 6-2. Recolección de las esporas en 3 medios de cultivo a distintos pH. YGC (Agar extracto de levadura- glucosa- Cloranfenicol), SB (Agar-Dextrosa 4% Sabouraud), PDA (Papa-Dextrosa).....	50
Figura 6-3 Gráfico lineal del logaritmo de los Recuento de colonias de <i>A. brasiliensis</i> en Agar Sabouraud-Dextrosa 4% vs Diluciones ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ).....	54
Figura 6-4. Morfología microscópica a partir de medio de cultivo Agar Sabouraud - Dextrosa 4%, de <i>A. brasiliensis</i> , por tinción con Azul de lactofenol visto en 140x. a. b. y c. observación microscópica en cada uno de los tres ensayos.....	57
Figura 6-5. Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> sembrado por punción en Agar Sabouraud–Dextrosa 4 %. a. b. Observación macroscópica del crecimiento del hongo y su reverso (respectivamente).....	59
Figura 6-6. Análisis estadístico del logaritmo de los resultados tanto para Cámara de Neubauer como Recuento en Placa. Parámetros analizados, Promedio, (%CV) coeficiente de variación, (Desv Est) desviación estándar, bajo un nivel de confianza del 95%. .....	62
Figura 6-7. Gráfico de Torta .Correlación entre los promedios de los Conteo en cámara de Neubauer y Recuento en placa.....	64



## ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 5-1. Cronograma de actividades realizadas durante el desarrollo de la práctica empresarial en LABORATORIO MICROBIOLÓGICO BARRANQUILLA S.A.S.....	46
Tabla 6-1. Recuento de esporas de <i>A. brasiliensis</i> partiendo de la dilución $10^{-1}$ , en 5 cuadrados de los 25 medianos de la cámara de Neubauer establecidos para conteo de estructuras asexuales reproductivas de hongos. Tres ensayos distintos c/u por triplicado.....	51
Tabla 6-2. Ajuste del Inóculo de <i>A. brasiliensis</i> . Conteo de esporas a partir de la dilución $10^{-1}$ por triplicado durante tres distintos ensayos. Resultado obtenido aplicando la fórmula establecida para determinar la concentración por conteo en un Hematócmetro. <sup>23</sup> .....	52
Tabla 6-3. Recuento y promedio de las colonias de <i>A. brasiliensis</i> durante los tres distintos ensayos luego de transcurrido los 7 días de incubación. Sembrado por triplicado, por superficie (0,1 ml), en Agar Sabouraud-Dextrosa 4%, de las diluciones $10^{-4}$ a $10^{-7}$ , a partir del Inóculo del <i>A. brasiliensis</i> ajustado a una concentración de $1,0 \times 10^6$ esporas/ml. (Anexo 3). .....	53
Tabla 6-4. Viabilidad de <i>A. brasiliensis</i> estimada del recuento de colonias en los 3 ensayos por triplicado, provenientes de la dilución $10^{-4}$ sembrada en Agar Sabouraud- Dextrosa 4%. Resultado del recuento multiplicado por el factor de la dilución ( $1 \times 10^4$ ) y su respectivo promedio.....	55
Tabla 6-5. Análisis estadístico de logaritmo <sub>(10)</sub> del recuento de las colonias (UFC/ml) de <i>A. brasiliensis</i> en Agar Sabouraud-Dextrosa 4% a partir de la dilución de la que se obtuvo la viabilidad del microorganismo ( $10^{-4}$ ). Análisis estadístico del logaritmo <sub>(10)</sub> de los conteos en cámara de Neubauer para el ajuste del Inóculo. Parámetros del análisis estadístico, promedio de los datos, Coeficiente de variación, Desviación Estándar, intervalos de confianza (límite superior, límite inferior). .....	60
Tabla 6-6. % de recuperación de esporas viables, partiendo de un total de esporas viables y no viables, contadas en Cámara de Neubauer para ajuste del Inóculo de <i>A. brasiliensis</i> , por conteo directo al microscopio. Verificado por recuento en placa, obteniendo. % de recuperación igual al logaritmo del promedio de la viabilidad (suministrado por la tabla 5) / el logaritmo <sub>(10)</sub> del promedio de esporas contadas en cámara (conteo suministrado por las tablas 2 y 3), multiplicando dicho resultado por 100.....	63

## INDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1. CERTIFICADO DE ORIGEN DE LA CEPA *A. brasiliensis* ATCC 16404.**
- ANEXO 2. PLANILLAS DE CONTROL DE AMBIENTES DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR**
- ANEXO 3. PROCEDIMIENTO DE ETANDARIZACIÓN (MATERIAL FOTOGRÁFICO)**
- ANEXO 4. Gráfico exponencial del promedio de los Recuentos de colonias de *A. brasiliensis* en Agar al 4% de Dextrosa Sabouraud vs Diluciones ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ).**
- ANEXO 5. Recuento en placa en agar al 4% de Dextrosa Sabouraud de *A. brasiliensis***

## INTRODUCCIÓN

Las empresas de alimentos deben ofrecer una mayor calidad a los consumidores, razón por la que existen laboratorios que lleven a cabo análisis microbiológicos y fisicoquímicos para verificar la confiabilidad del producto, evaluando la calidad de éstos, de las empresas y el personal que los elaboran.<sup>43</sup>

Las técnicas utilizadas para llevar a cabo los análisis en un laboratorio deben ser verificadas. La validación de una técnica, es el procedimiento por el cual se regula mediante estudios de laboratorio si las características de desempeño del método analítico cumplen las exigencias para la aplicación analítica propuesta.<sup>43</sup> Entonces la validación ofrece evidencia de que un método es capaz de servir para su propósito planeado, es decir, para poder detectar o cuantificar un grupo microbiano o un microorganismo específico con total precisión y exactitud.<sup>40</sup>

La estandarización de las cepas con las cuales se validan los análisis que ofrecen los laboratorios a sus clientes, es el paso del cual se partirá para estimar la concentración de dichas cepas, teniendo en cuenta que los procedimientos en microbiología, penden que los microorganismos viables en los cultivos sean capaces de mantener sus características reproducibles y morfológicas.<sup>40</sup>

La estandarización de cepas de trabajo, es requerida a nivel cualitativo y cuantitativo, en actividades curriculares que atienden al control de calidad de los procesos llevados a cabo en el laboratorio, donde por ejemplo, se necesiten cepas tipo control positivo o negativo para valorar medios de cultivo, pruebas bioquímicas entre otros. Por tanto es de mucha utilidad un cultivo medido que puede ser preparado por el propio laboratorio, o provenir de uno de referencia ya cuantificado.<sup>25</sup>

Laboratorio Microbiológico de Barranquilla (LMB) ofrece sus servicios en distintos análisis a las empresas de alimentos y aguas en el país.<sup>47</sup>

En el proceso de aprendizaje como practicante en el LMB, las tareas diarias asignadas llevadas a cabo son, el procesamiento de aguas y alimentos y los respectivos recuentos para cada procedimiento, la verificación del ambiente microbiológico de las cabinas de seguridad, así como un control mensual del

ambiente en las zonas de trabajo, de las cabinas y las neveras, incluyendo una inspección de las temperaturas de éstas, la preparación de medios de cultivo, control de la autoclave, y el diligenciamiento de toda la documentación referente a la trazabilidad de los procesos que regula el área de control interno de calidad del laboratorio, el cual es el encargado de asignar la realización de este proyecto requiriendo un estudio de las cepas que son adquiridas, como requisito exigido por los entes que evalúan al laboratorio.

Dentro de los análisis que se realizan en el procesamiento de las diferentes matrices, se incluye el de mohos y levaduras. Siendo de gran importancia cuantificar los hongos filamentosos y levaduras en los alimentos, ya que la cuenta de estos microorganismos, permite precisar prácticas sanitarias incorrectas, almacenamiento deficiente y uso de materia prima inadecuada. <sup>49</sup>

El término moho suele ser utilizado para designar a algunos hongos filamentosos. <sup>11</sup> El Género *Aspergillus* se caracteriza por ser mitospórico, y por la producción de hifas especializadas, llamadas conidióforos, en donde se encuentran las células conidiógenas las cuales originarán las esporas asexuales o conidios.<sup>1</sup> Su importancia está relacionada con el conocimiento de las especies patógenas y su aprovechamiento agroalimentario e industrial. ***Aspergillus brasiliensis*** hace parte de este género y está incluido en los *Aspergillus* de la sección *Nigri*. <sup>55</sup>

Para hallar la concentración de los microorganismos, los métodos utilizados dependen del tipo de microorganismo y las características de éstos, como las diferencias en cuanto a sus crecimientos, sus estructuras celulares, y sus características morfológicas, tales como, si son pigmentados o no, el tamaño de las células, entre otras. Los métodos para estandarizar bacterias difieren de los utilizados para estandarizar hongos filamentosos y a su vez entre los utilizados para levaduras, teniendo en cuenta que por ser organismos pluricelulares resulta difícil cuantificar sus células de manera individual. Ahora bien ¿Cómo es posible verificar la reproducibilidad de estos resultados y precisar la fluctuación que puede existir en cada ensayo?, por medio de análisis estadísticos, que permitan observar la dispersión existente entre los datos experimentales. <sup>9</sup>

Esta experiencia se basó en la estandarización del Inóculo de ***A. brasiliensis*** por la técnica de conteo directo de conidios en cámara de Neubauer, soportado por recuento en placa para evaluar la viabilidad del microorganismo y su pureza tanto por análisis morfológico macroscópico de las colonias en las placas, como por microscopia óptica.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar el Inóculo de *A. brasiliensis* para su uso en Pruebas de Control de Calidad y Validación de Análisis de Mohos en el Laboratorio Microbiológico de Barranquilla.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar condiciones de carga microbiana del ambiente de la cabina de flujo laminar.

Seleccionar de los medios de cultivo disponibles en el laboratorio el que mejor promueve la esporulación de *A. brasiliensis*

Evaluar la viabilidad y pureza del Inóculo de *A. brasiliensis*

Verificar por parámetros estadísticos la adecuada estandarización del Inóculo de *A. brasiliensis*

Determinar el Porcentaje de Recuperación de las esporas de *A. brasiliensis*

## 2 JUSTIFICACIÓN

El LMB ha implementado el Sistema de Gestión de Calidad bajo la norma ISO 9001:2000 (Sistema de Aseguramiento de Calidad) el cual está certificado por ICONTEC, y la norma ISO/IEC 17025:2005, las cuales establecen los Requisitos generales que hacen competitivos a los Laboratorios de Ensayo y Calibración.<sup>47</sup> El Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio ha sido evaluado y auditado de manera exitosa por entidades oficiales como el ICA, el INVIMA, IDEAM y el ONAC así como en repetidas ocasiones por el ICONTEC el cual verifica el cumplimiento de las normas que rigen a los laboratorios.<sup>47</sup>

Todos los ensayos, llevados a cabo en el área de Microbiología, tanto los de alimentos como los de aguas (potables, residuales, de uso doméstico, y de recreación) están debidamente verificados de manera continua por controles internos de calidad, lo cual es de suma importancia, ya que, de no ser así, no podría tenerse la seguridad de que los métodos analíticos que se utilizan para detectar si el nivel de uno o más microorganismos analizados en las muestras que los clientes envían al laboratorio, se encuentran dentro de los rangos permisibles para ser aceptadas o rechazadas. Estos análisis son validados con objeto de confirmar mediante la provisión de evidencia clara y objetiva que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica predicha.<sup>40</sup>

La Validación de análisis, como también las diferentes actividades que hacen parte del sistema de control de calidad, bien sea, la valoración de medios de cultivos, preparación de controles positivos, y negativos, Test Ecométricos, verificación de potencial bactericida de las lámparas UV (ultra violeta) de las cabinas de Flujo laminar, entre otras, requieren de la utilización de cepas de referencia estandarizadas, las cuales son el patrón de partida y la Herramienta principal como material de trabajo en un laboratorio de microbiología. Estas cepas son *“Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivo que se encuentra activo o liofilizado donde no se conoce el número de microorganismos”*.<sup>25</sup> Por tal razón es indispensable reunir toda la información necesaria sobre los cultivos con los que se ha de trabajar, Normalizándolos, lo que quiere decir que sean definidos en sus características principales, como su concentración, pureza y viabilidad, con el fin de validar que cumplan con los requerimientos mínimos de calidad, siendo los cultivos patrones que se utilizarán para lo que se halla requerido. Por ello la Estandarización o Normalización tiene como objetivo definir y validar el objeto de estudio que para este caso es el Inóculo de ***A. brasiliensis***.<sup>2</sup>

El LMB actualmente ofrece análisis de hongos filamentosos y levaduras en distintas matrices, dichos análisis están por ser validados y acreditados ante la ONAC (Organismo Nacional de acreditación en Colombia), el cual tiene como finalidad fundamental, acreditar la competencia de los Organismos de Evaluación por cumplimiento de normas y criterios señalados en los Estatutos de la entidad evaluadora, llevando un registro público y renovado de los Organismos acreditados.<sup>28</sup> El ONAC en unas de sus visitas al laboratorio sugirió que para la utilización de Cepas de Referencia Fúngicas con objeto de validar análisis de hongos filamentosos y levaduras, es necesario que los dos grupos fúngicos estén estandarizados. Primeramente en el laboratorio ya se había llevado a cabo la estandarización de la levadura (***Candida albicans***), siendo un faltante la estandarización del hongo, ya que las levaduras difieren de los hongos filamentosos y por tanto no es posible utilizar como referencia de partida la cuantificación de levaduras para validar análisis de hongos filamentosos.

El anterior contexto generó la necesidad de realizar la estandarización del Inóculo, de ***A. brasiliensis***, para su uso en pruebas de control de calidad y Validación de análisis de mohos en el Laboratorio Microbiológico de Barranquilla, Utilizando el método de recuento en Cámara de Neubauer soportado por Recuento en Placa, haciendo hincapié en que la metodología espectrofotométrica no es recomendada como un procedimiento adecuado para la preparación del Inóculo de hongos filamentosos, ya que el color y el tamaño de las esporas pueden influir en los valores de densidad óptica (DO) siendo posible que uno de los factores que más distorsiona este tipo de lecturas es la presencia de hifas, sobre todo en especies que no esporulan eficientemente, obteniéndose lecturas erradas de turbidez heterogénea en vez de homogénea, como la que se observa en un Inóculo a base de conidios<sup>34</sup>, por tanto una mejor opción frente al método espectrofotométrico para estandarización de Inóculos Fúngicos filamentosos como alternativa, es la enumeración de esporas en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer).<sup>49</sup>

Los *Aspergillus* Sección *Nigri* tienen un impacto significativo en la sociedad moderna y son industrialmente uno de los grupos más importantes de hongos filamentosos, ya que muchas especies de este grupo causan daños en los alimentos, y a su vez son utilizados en la industria de la fermentación para producir enzimas hidrolíticas. Ellos también son manipulados genéticamente con fines biotecnológicos.<sup>55</sup> Además de su importancia económica, son relevantes por ser productores de ocratoxina, siendo organismos que contaminan varios productos agrícolas incluidos los productos derivados de la uva, café y cacao.<sup>56</sup> ***A. brasiliensis*** hace parte de los *Aspergillus nigri* y es una de las especies más recientemente identificada, estrechamente relacionada con ***A. niger*** siendo esta

última una de las cepas fúngicas más usada en el laboratorio (LMB) como herramienta de trabajo, y la más común y más estudiada de este gran grupo de los *Aspergillus*, no obstante resulta de gran interés las características genotípicas, y a nivel de los extrolitos que producen cada una de éstas dos especies, las cuales las hace diferentes, similares y a ***A. brasiliensis*** única. Por tanto se busca trabajar con un microorganismo fúngico filamentoso que difiera de las levaduras, que sea de importancia en la industria de los alimentos, (teniendo en cuenta que el laboratorio ofrece sus servicios a este sector) y novedoso para el laboratorio.

Es necesario trabajar con cultivos que mantengan sus características tanto genotípicas como fenotípicas, y se conserven viables, por ello se evaluó la pureza y viabilidad del microorganismo. Con objeto de tener la seguridad de que el número de ensayos no influyera en la fluctuación de los resultados se determinó por parámetros estadístico la adecuada estandarización del Inóculo de ***A. brasiliensis***.



### 3 MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 BASES LEGALES

Alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos Generales y directrices para Análisis Microbiológicos, establece que la validación de los métodos de referencia está en proceso de investigación por parte de instancias de normalización (Nacional, Regional e Internacional). <sup>39</sup>

Guía Técnica GTC 84 colombiana 2003-02-26. Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. Establece los modelos matemáticos de variación (Análisis Estadístico). <sup>28</sup>

Todos los procedimientos del laboratorio están certificados por la Norma ISO/IEC 17025:2005. <sup>47</sup>

El Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio está bajo la norma ISO 9001:2000. Sistema de Aseguramiento de Calidad. <sup>47</sup>

NORMA Técnica número 235 para la identidad y especificidad de la Cámara tipo Neubauer para el Conteo de Células (Hematímetro). Secretaría de Salud de Estados Unidos mexicanos-. De acuerdo con lo señalado en los Artículos 14, 195 y 196 de la Ley General de Salud, y el Artículo 15, fracciones I y II del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, se emite la siguiente norma técnica. Las disposiciones de la presente Norma Técnica son de orden público e interés social y tienen por objeto determinar las especificaciones mínimas de funcionamiento y seguridad que debe tener la cámara tipo Neubauer para el conteo de células (Hematímetro). <sup>51</sup>

### 3.2 ANTECEDENTES

El trabajo de Petrikkou y colaboradores (2001) buscó la estandarización de la preparación del Inóculo de hongos filamentosos emergentes, para pruebas de sensibilidad antifúngica. Donde se estudiaron un total de 156 cepas pertenecientes a 8 especies diferentes, preparando suspensiones de Inóculos en agua destilada estéril o Tween 20 al (0,1%). Los Inóculos se ajustaron por enumeración de esporas utilizando cámara de Neubauer, y se cuantificó en placas de Sabouraud. La gama de unidades de DO obtenido, era muy amplia para todas las especies analizadas. Por lo tanto, ellos sustentan que un método espectrofotométrico no puede recomendarse como un procedimiento correcto para la preparación del Inóculo de hongos filamentosos, siendo la enumeración de las esporas por medio de una cámara de Neubauer un procedimiento adecuado y universal para el ajuste de Inóculo de hongos filamentosos. Además se determinó que los Conteos de Colonias estuvieron en un promedio relacionado con el ajuste inicial en la cámara de Neubauer, a excepción de 6 cepas. <sup>45</sup>

En el mismo año (2001) Petrikkou y sus ayudantes compararon los dos métodos de preparación del Inóculo para los hongos filamentosos, (hematocitómetro y ajuste espectrofotométrico), utilizando hongos filamentosos patógenos para los seres humanos. Los recuentos de colonias los realizaron para todas las preparaciones de Inóculo. El acuerdo entre los recuentos hematocitómetro y los recuentos de colonias (UFC por mililitro) fue del 97,2%. La reproducibilidad entre los recuentos hematocitómetro y los recuentos de colonias por medio de un coeficiente de correlación intraclase fue de 0,70. Aunque para este ensayo experimental se hizo uso de ambas metodologías, el método espectrofotométrico requiere que cada especie se normalice por separado, estando en desventaja con respecto al método de conteo en cámara de Neubauer. <sup>44</sup>

Dentro de los estudios realizados se encuentra la experiencia de Casas (2005) la cual tenía como finalidad la producción industrial de Lovastatina por la fermentación discontinua de ***Aspergillus terreus***. La preparación del Inóculo se realizó a partir de un liofilizado del microorganismo. La concentración de esporas se midió por recuento en cámara de Neubauer ajustando la dilución adecuada para alcanzar una concentración de  $10^6$ . <sup>16</sup>

El procedimiento del trabajo realizado por Gómez y Mendoza (2004) sobre la producción de un hongo filamentoso entomopatógeno, para su utilización en manejo de plagas en caña de azúcar, sugiere el uso de conteo directo de esporas en cámara de Neubauer, soportado por recuento en placa, con el fin de preparar y ajustar a una concentración el Inóculo. A su vez llevaron a cabo pruebas de germinación de las esporas y evaluaron la pureza de éstas. <sup>26</sup>

Aguirre en el año 2006 con el fin de establecer el efecto de algunas fuentes de carbono, nitrógeno y de pH sobre el desarrollo del entomopatógeno *Nomuraea rileyi*, diseñó unas condiciones basadas en diferentes fuentes tales como el Almidón soluble, por ejercer un poder inductor sobre la germinación, el crecimiento y la esporulación del hongo filamentoso. Los resultados mostraron que las fuentes de Nitrógeno y Carbono tienen un efecto relevante sobre *N. rileyi* sobre todo cuando los dos sustratos se encuentran juntos en el mismo medio de cultivo y que a pH levemente ácidos colindantes a 6 el desarrollo del microorganismo es superior. <sup>4</sup>

Por otro lado Cruz en el 2007, realiza la estandarización de las condiciones de fermentación bifásica (sólida y líquida) del hongo *Trichoderma koningii* para alcanzar concentraciones de biomasa con fines de producción a escala industrial. <sup>18</sup>

Para la obtención del pre Inóculo de *T. koningii* se preparó una suspensión madre de conidios a partir del raspado de una caja con PDA, con el hongo esporulado. Los conidios se suspendieron en agua destilada con Tween 80 al 0.1%, realizando diluciones seriadas, ajustando la concentración inicial a  $1 \times 10^7$  conidios/ml, por recuento de conidios en cámara de Neubauer, donde la pureza del caldo se evaluaba mediante observación al microscopio con azul de lactofenol. La cuantificación de la biomasa (conidios/g) también fue medida por la técnica de recuento de conidios en cámara de Neubauer. La viabilidad del hongo se valoró por recuento en Agar Sabouraud-Rosa de bengala, y la germinación del hongo mediante siembra en agar extracto de malta. Los resultados finales se sometieron a análisis estadístico de varianza ANOVA a un nivel de confianza del 95%. <sup>18,3</sup>

En el año 2012 Fernández analizó la producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger*. <sup>24</sup>

Para la preparación de Inóculos de las cepas se reunieron las esporas de un matraz con PDA donde se encontraban las cepas sembradas. La colecta de esporas se realizó en una solución Tween 20 al 0.1%. Se realizó el recuento de conidios en Cámara de Neubauer hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^4$  esporas/ml. <sup>24</sup>

### **3.3 SISTEMA TÉORICO**

#### **3.3.1 Generalidades sobre las cepas de trabajo en un laboratorio de Microbiología**

##### **3.3.1.1 Definiciones de material microbiológico**

- **Cepa de colección**

Microorganismos determinados por lo menos a nivel de género y especie, los cuales han sido guardados y mantenidos en una Colección de Cultivos (CC) o Centro de Recursos Biológicos (BRC) y clasificados con el acrónimo de la colección/BRC seguido de un número de identidad. En dicho catálogo se indica el origen de la cepa, sus condiciones de cultivo y, sus características. Es semejante a cepas de referencia. <sup>25</sup>

- **Cepas de reserva**

Cepas iguales que se obtienen mediante un único subcultivo de una cepa de referencia que ha suministrado el proveedor, o que provienen directamente del proveedor. <sup>25</sup>

- **Cepas de trabajo**

Subcultivos primarios adquiridos de una cepa de reserva. <sup>25</sup>

##### **3.3.1.2 Utilidad de las cepas de trabajo**

Las cepas o colecciones de cultivos pueden apoyar a la hora de formar los modelos necesarios para estandarizar los cultivos de trabajo. Dado que se

dispone en los laboratorios de los profesionales cualificado para ello, éstos pueden realizar los ensayos necesarios para precisar curvas de crecimiento patrón para los microorganismos más solicitados, especificando las condiciones de cultivo en cuanto al medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, agitación, Inóculo, etc., e implementando algún procedimiento informático que permita al laboratorio de ensayo conocer de forma inmediata el número de microorganismos de su cultivo a partir de la densidad óptica del mismo o por otro tipo de parámetro que emita la concentración del cultivo. El proveedor también puede facilitar el proceso de esta forma, el usuario solamente tendría que seguir exactamente las instrucciones dadas por la colección y no tendría que elaborar sus propias curvas de calibrado, lo cual ayudaría enormemente a la tarea de los laboratorios de ensayo a la hora de obtener valores de referencia adecuados a cada necesidad. <sup>25</sup>

### **3.3.2 Validación de los métodos**

El término “validación” se utiliza para denotar el proceso que suministra evidencia clara y objetiva de que el método, independientemente cual sea, es capaz de servir para su uso esperado, ejemplo: detectar o cuantificar un microorganismo o grupo de microorganismos específicos; entonces es necesario que para comprobar que el método utilizado cumple con los requisitos especificados para su uso en particular, se evalúen todas sus características de desempeño. <sup>40, 42</sup>

La validación de un método toma gran importancia ya que se convierte en la demostración tanto escrita como experimental, con un gran porcentaje de confianza, de que un proceso arrojará de manera sólida, permanente y segura, resultados con características de calidad predefinidas. <sup>42</sup>

El término “verificación” se utiliza, para enunciar el proceso que lleva a cabo el laboratorio con objeto de corroborar su capacidad para elaborar correctamente un método normalizado o estándar cuando se lleva a cabo exactamente como está descrito en las normas. <sup>40</sup>

#### **3.3.2.1 Métodos normalizados**

El Laboratorio utiliza un método normalizado que se emplea exactamente como está descrito en las normas. En este caso el laboratorio debe ratificar que puede emplearlo cabalmente previo a su uso en ensayos, mediante la demostración del

cumplimiento de las medidas estadísticas que conforman el método normalizado.  
40

### **3.3.2.2 Métodos modificados**

El Laboratorio realiza cambios al método de ensayo normalizado las cuales pueden repercutir en la calidad de los resultados. En el caso de los métodos para análisis microbiológicos se sugiere modificaciones importantes. 40

### **3.3.2.3 Métodos alternativos**

El Laboratorio utiliza métodos alternos o métodos rápidos de ratificación. Es aquí, cuando se dispone de los datos de validación, donde el Laboratorio debe realizar una verificación de su aplicabilidad. Los datos de validación pueden obtenerse de ensayos ya hechos o de datos suministrados por el fabricante y sometidos a la evaluación de terceros. de no se tenga esta información (datos de validación), o estos no sean todo aplicables, el Laboratorio debe llevar a cabo la validación, antes de Cuando poner en marcha el método en el laboratorio, siguiendo los requisitos establecidos en la Norma ISO16140 comprendiéndose como (ISO), organización internacional de Estandarización, o los protocolos de la Asociación internacional de métodos oficiales de análisis (AOAC), y el sistema nórdico para la validación de métodos microbiológicos alternativos (NordVal). 40

### **3.3.2.4 Protocolo de Validación**

Con el fin de organizar y planificar las actividades de la validación se debe elaborar un protocolo de validación que incluya:

- **Objetivo o alcance**  
Ámbito de aplicación del ensayo a validar. Donde es relevante la especificación de la matriz, sobre todo cuando se pueden generar

diferencias significativas en la recuperación de los microorganismos y en el rango de aplicación en el caso de los ensayos cuantitativos. <sup>40</sup>

- **Personal que llevará a cabo la validación** <sup>40</sup>
- **Metodología y diseño experimental**  
Este debe incluir la, enunciación del analito, la identidad de las muestras (naturales o inoculadas) utilizadas en la validación, la preparación de las mismas, los microorganismos utilizados, la estandarización del Inóculo, las condiciones del ensayo. <sup>40</sup>
- **Listado de equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos y cepas de referencia.** <sup>40</sup>
- **Condiciones ambientales, cuando corresponda.** <sup>40</sup>
- **Parámetros de desempeño a determinar.** <sup>40</sup>
- **Criterios de aceptación para cada uno de los parámetros.** <sup>40</sup>
- **Análisis estadístico.** <sup>40</sup>
- **Metodología para el cálculo de la incertidumbre, cuando corresponda.** <sup>40</sup>
- **Registros asociados.** <sup>40</sup>

### **3.3.2.5 Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas**

Es importante el uso de métodos validados en todo sistema de calidad. En particular, la validación de los métodos microbiológicos es de suma relevancia por la propia naturaleza de los organismos vivos, los cuales presentaran una capacidad de variaciones, comportamientos distintos y cambios genéticos y mutaciones. Es por ello imprescindible la validación de los métodos microbiológicos alternativos. La norma ISO 16140:20036 ha sido elaborada para satisfacer esta necesidad tanto para los métodos cualitativos como cuantitativos. <sup>41</sup>

Es importante que el laboratorio se asegure de escoger de forma correcta el método para el análisis, ajustándose al objetivo en cuestión, sobre todo para los procedimientos de recuentos de microorganismos, y así de esta manera obtener resultados seguros. <sup>41</sup>

La palabra "alternativo" demarca que los métodos estandarizados de referencia, como aquellos que son publicados por la ISO, conservarán su importancia en el comercio internacional. Los métodos de referencia suelen ser trabajosos, caros y extensos. Por ello, se eligen para el uso rutinario, métodos más baratos, rápidos y convenientes. <sup>41</sup>

- **Validación de un método Microbiológico Cuantitativo Alternativo**

Un método cuantitativo es definido por ISO como un método de análisis, cuya respuesta es la cantidad del mesurando, medido directamente (ej. enumeración en una masa o en un volumen) o indirectamente (ej. absorbancia del color, impedancia, etc.) en una cantidad determinada de muestra. En el control de calidad de aguas y alimentos, su aplicación es relevante, ya que permite mostrar si el nivel de uno o más microorganismos se encuentra dentro de los rangos permisibles para la declaración de su inocuidad. <sup>41</sup>

La validación en términos cuantitativos se formula en forma de recuentos y siendo agrupados otros datos tales como: el peso de la muestra, las diluciones seriadas empleadas, el volumen de Inóculo, así como los recuentos obtenidos en cada dilución. <sup>41</sup>

Para el análisis de los resultados, se tienen en cuenta los recuentos de aquellas placas que tengan 300 unidades formadoras de colonias (UFC) o menos, y se aplica posteriormente el recálculo teniendo en cuenta el factor de dilución para obtener los valores finales. Según las recomendaciones de las guías de validación de organizaciones, como ISO, NordVal, AOAC, ISO 17994, específico para análisis de aguas, los resultados se transforman a logaritmos ( $\log_{10}$ ) para obtener una función lo más cercana a la distribución normal. Este artificio matemático ha sido empleado por varios especialistas en el análisis estadístico de estudios desarrollados aproximadamente a partir de la década de los años 80. <sup>41</sup>

### **3.3.3 Generalidades de hongos filamentosos**



Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen por esporas, sexual o asexualmente. Los hongos carecen de clorofila, por ello no realizan fotosíntesis, necesitando materia orgánica ya elaborada para sus requerimientos nutricionales. Poseen una pared celular rica en quitina, el cual es un compuesto (polísacarídico) fuertemente rígido. Por lo anterior, estos microorganismos deben absorber nutrientes simples y solubles, y no fagocitar los alimentos. La estructura fúngica tiene de un complejo llamado talo o micelio, que está formado por muchos filamentos o hifas (hyphomycetos o mohos), la gran mayoría de estos hongos no son móviles más sin embargo algunos pueden tener células germinativas móviles. Las esporas son formas resistentes que constituyen a los hongos en estado latente o reposo, las cuales se producen de dos maneras distintas sexual y asexualmente. Las sexuales tienen núcleo derivado de células ascendientes, y sus esporas son haploides; dos núcleos de células antecesoras se funden para formar un núcleo diploide (zigoto) y las estructuras que producen las esporas son, casi siempre, morfológicamente diferenciadas de las esporas asexuales. Distinto, a las estructuras que producen las esporas asexuales, que se originan por simple diferenciación en la hifa de crecimiento. <sup>5</sup>

Los hongos filamentosos en su fisiología se adaptan a condiciones más extremas que otros microorganismos, su crecimiento en sustratos puede ser con concentraciones de azúcares altas, hasta el 10%, ya que estos microorganismos no son débiles frente a la presión osmótica elevada; con crecimiento lento de 5 - 7 días, y resistiendo bajo condiciones de acidez relativamente altas. <sup>5</sup> Los hongos pueden crecer mejor en ambientes con un pH promedio de 5. Éste es fundamental para el desarrollo de los hongos, a un pH alto se ve afectada la solubilidad de los metales y a pH bajo se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales y ácidos orgánicos y la toma de minerales. <sup>5</sup>

En cuanto a sus necesidades de oxígeno para crecer, todos los hongos filamentosos son aerobios. <sup>49</sup>

La temperatura también influye en el crecimiento, la germinación de esporas, reproducción y, de manera general, en todas las actividades del organismo. En base a este parámetro los hongos se pueden clasificar como psicrófilos, mesófilos o termófilos. <sup>5</sup>

### **3.3.3.1 Factores que afectan el crecimiento de los hongos filamentosos.**

Dentro de los factores que condicionan el crecimiento y la actividad microbiana están la Temperatura, condiciones químicas, físicas del ambiente, el pH, la radiación solar, la humedad relativa, el agua, los nutrientes entre otros. <sup>4</sup>

Todos los hongos están en contacto con soluciones acuosas las cuales se encuentran en la naturaleza y la concentración de hidrogeniones que se encuentra en estas soluciones ejerce un efecto significativo sobre el crecimiento fúngico. <sup>4</sup>

En los medios de crecimiento el pH controla la disponibilidad de algunos iones metálicos, por ejemplo iones Magnesio y fosfatos son solubles a pH bajos, lo cual cambia a pH alto, formando complejos insolubles reduciendo así su disponibilidad. <sup>4</sup>

El pH también afecta la permeabilidad celular debido a compuestos que se ionizan. Las enzimas también tienen un pH óptimo para ejercer su actividad así como pueden ser inactivadas a pH extremo. Los hongos tienen un pH amplio óptimo de crecimiento sin embargo la mayoría de crecen a pH menor de 7 ya que por encima podría afectarse su actividad enzimática y a su vez la actuación de éstas en los procesos metabólicos. <sup>4</sup>

El peso de las células Fúngicas equivale a carbono, por ello es de suma importancia. Los compuestos orgánicos son necesarios como materiales estructurales, proveyendo energía para los procesos de oxidación. Los hongos pueden utilizar además de la glucosa fuentes de carbono como la sacarosa, lactosa, maltosa, y polisacáridos como almidón, celulosa, pectina, entre otros. <sup>4</sup>

Otra fuente importante es el Nitrógeno, el cual es requerido por los hongos para Síntesis de Novo. La preferencia de los hongos en cuanto a fuentes de nitrógeno es la úrea y el hidrolizado de caseína, ya que éstos contienen una mezcla de aminoácidos que hace más rápido el crecimiento de los microorganismos. <sup>4</sup>

### **3.3.3.2 Importancia de los mohos y sus análisis en los alimentos**

Los hongos filamentosos y levaduras están abundantemente distribuidos en la naturaleza y se pueden hallar formando parte de la flora normal de un alimento, o

como causales de contaminación en los equipos mal sanitizados, provocando el daño fisicoquímico de éstos, produciendo mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos. También estos dos grupos fúngicos pueden sintetizar metabólicos tóxicos resistentes a altas temperaturas, aptos para soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y muestran capacidad para modificar sustratos de forma desfavorable, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. <sup>49</sup>

Algunos hongos generan productos metabólicos que son tóxicos para los huéspedes humanos. Más aún, en esos casos la toxina solo resulta ser una causa indirecta de la enfermedad, puesto que el hongo ya ha crecido dentro del huésped o sobre él. Las infecciones micóticas crónicas, como las generadas por mohos que crecen en los hogares, también pueden producir una respuesta alérgica en el huésped. <sup>49</sup>

Es de gran importancia cuantificar los hongos filamentosos y levaduras en los alimentos, ya que al establecer el conteo de estos microorganismos, se permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias incorrectas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así también como del uso de materia prima inadecuada. <sup>49</sup>

Hasta desde el punto de vista clínico podemos decir que la normalización de extractos de hongos comerciales resulta considerablemente importante como procedimiento de diagnóstico, así como para decidir una buena inmunoterapia y convincente. <sup>48</sup>

### **3.3.3.3 Género *Aspergillus***

Los *Aspergillus* son hongos filamentosos universales aislados de la naturaleza comúnmente encontrado en el suelo, restos vegetales y el aire ambiental. <sup>53</sup> El Género *Aspergillus*, como ***Aspergillus oryzae***, se ha utilizado durante mucho tiempo en la fabricación de ácido cítrico, salsa de soja y otros productos útiles. Por otro lado, se sabe que otras especies, como ***Aspergillus flavus***, son productores de toxinas y sustancias carcinógenas en los alimentos que contagian. Conjuntamente, otras especies como ***Aspergillus fumigatus***, causan enfermedades en humanos, animales y aves. Es un género, que se subdivide en subgéneros que comprenden secciones y más de 250 especies, Algunas especies

se consideran semejantes y otras distintas, muchas de éstas no pueden ser identificadas en su morfología, por ello su identificación está basada en técnicas de biología molecular.<sup>37</sup>

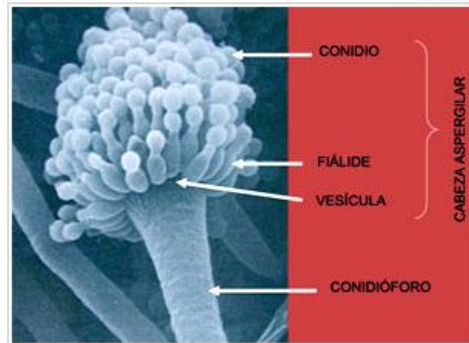
La estructura de las esporas es la característica microscópica más importante utilizada en la definición de miembros del género *Aspergillus*. Al darse la diferenciación micelial ciertas células desarrollan una pared celular pesada y forman células de pie en forma de 'T' o 'L', que no están separadas y que originan un solo conidióforo perpendicular al eje largo de la célula. La rama hifal que se despliega desde la célula del pie es el conidióforo, que se agranda en su ápice hasta formar una vesícula redondeada, elíptica o en forma de disco. El espacio fértil de la vesícula da lugar a una capa de células llamadas fiálides que producen largas cadenas de esporas mitóticas denominadas conidios o conidiosporas. El tamaño y la disposición de las cabezas conidiales, así como el color de las esporas que llevan son características de identificación importantes.<sup>37</sup>

El conidióforo característico de *Aspergillus* (Figura 3-1), aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas.<sup>34</sup>

El método de identificación propuesto por Klich y Pitt, utiliza tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación. Cada una de las cepa se siembra en tres puntos en dos placas de medio CYA (Czapek Yeast extract agar), una placa de CYA con 20% de sacarosa (CY20S), y una placa de MEA (agar extracto de malta). Una de las placas de CYA se incuban a 37°C y las restantes a 25°C. Después de siete días de incubación se realiza la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos.<sup>31</sup>

Los aislamientos se pueden obtener en Sabouraud y Agar Papa Dextrosa a 28°C. Este último es útil para inducir la esporulación de este grupo de hongos.<sup>53</sup>

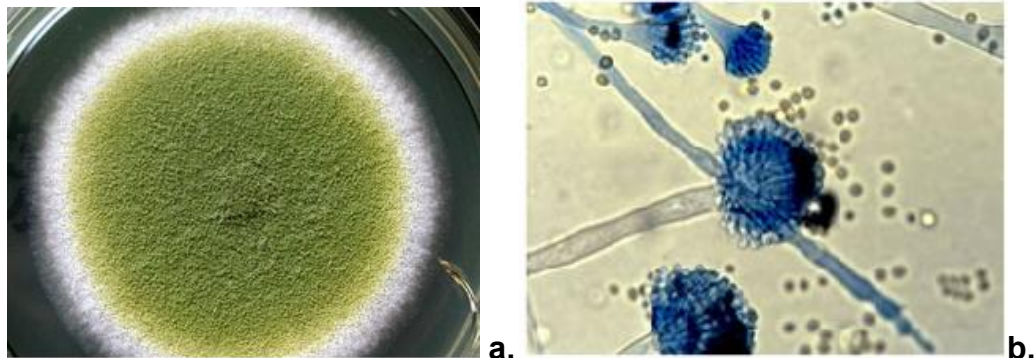
Figura 3-1. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus* sp. Cabeza aspergilar donde se observa el conidióforo, vesículas, fiálides y cadenas de fialoconidios, estructuras que intervienen en la reproducción asexual de los hongos de este género.<sup>34</sup>



(Universidad nacional autónoma de México UNAM, 2016)

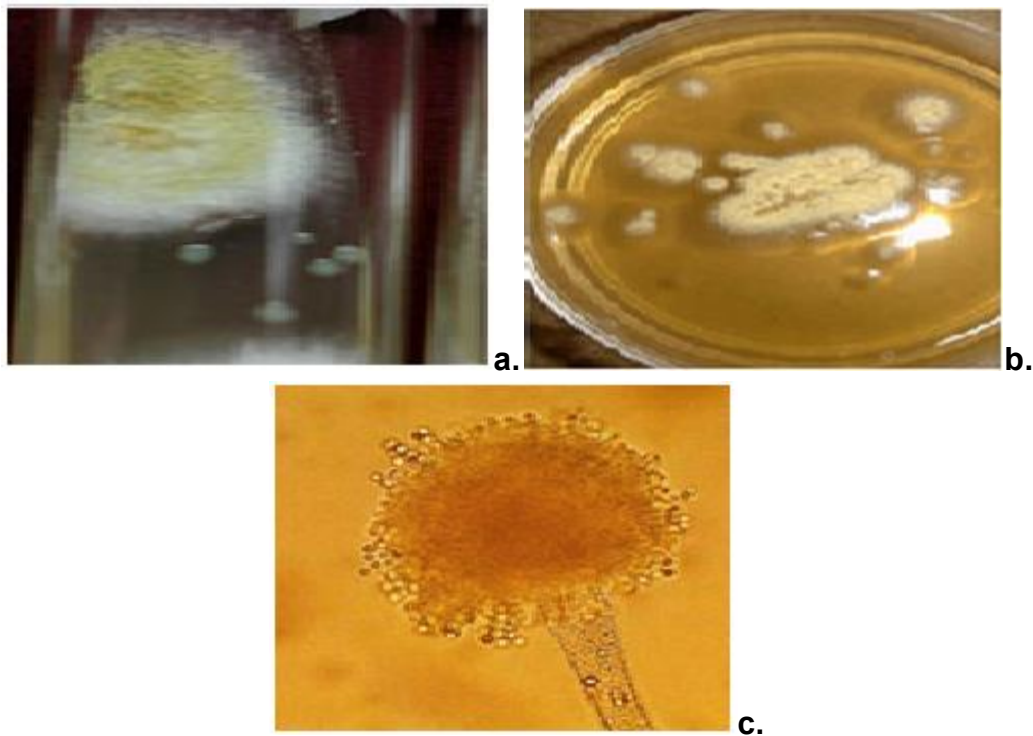
Dentro de los subgéneros de gran importancia de los *Aspergillus* se encuentran *Fumigati*, Sección *Fumigati*, Especie ***A. fumigatus***. Subgénero *Circumdati*, Sección *Flavi*, Especie ***A. flavus*** y del mismo Subgénero, Sección *Nigri*, Especie ***A. niger***. Subgénero *Aspergillus*, Sección *Aspergillus*, Especie ***A. glaucus***.<sup>37</sup> Desde la Figura 3-2 a la Figura 3-5, respectivamente.

Figura 3-2. a. Morfología de *A. fumigatus* a partir de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple. Colonia plana, de aspecto aterciopelado, de color verde olivo y en la periferia con un halo claro. b. El estudio microscópico teñido con azul de algodón permite visualizar cabezas aspergilaras con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula, las conidias son incoloras y miden 2 a 3  $\mu\text{m}$ . Dr. LJ Méndez Tovar.<sup>34</sup>



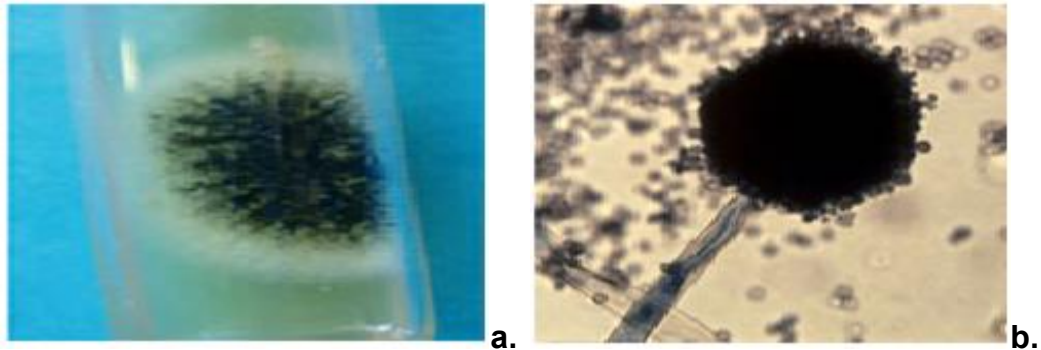
(Universidad nacional autónoma de México UNAM, 2016)

Figura 3-3. a. *Aspergillus flavus* a partir de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple. El primoaislamiento (izquierda) generalmente es verde amarillento; b. en resiembras de cultivos puede adquirir un color beige o amarillento (centro); c. El estudio microscópico muestra fiáldes dispuestas en toda la superficie de la vesícula del conidióforo. Dr. LJ Méndez Tovar. <sup>34</sup>



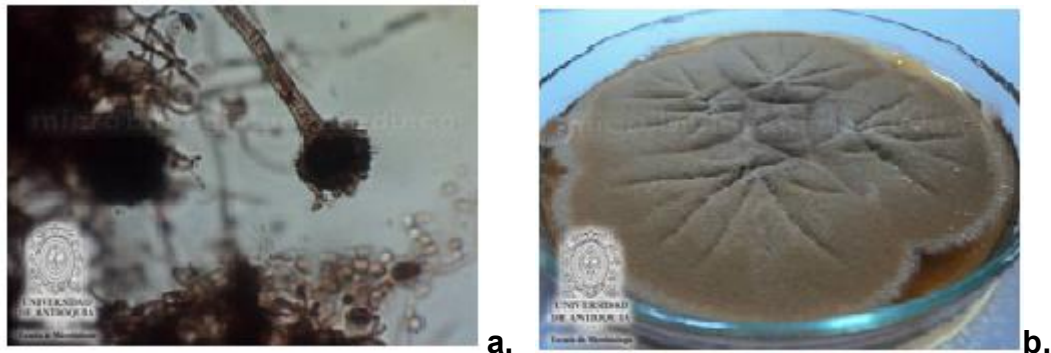
(Universidad nacional autónoma de México UNAM, 2016)

Figura 3-4. a. A partir de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple. Aunque el nombre *A. niger* sugiere color negro por el aspecto macroscópico de las colonias, las hifas son incoloras (hialinas). El color negro se debe a los conidios en la superficie del cultivo que son oscuras y cuyo diámetro puede ser hasta de 4  $\mu\text{m}$ . b. La vesícula está rodeada de fiálides por lo que los contornos de la misma no se pueden observar, este color de conidios y la disposición de las fiálides en los 360° son característicos de esta especie.<sup>34</sup>



(Universidad nacional autónoma de México UNAM, 2016)

Figura 3-5. a. Morfología microscópica a partir de cultivo de *Aspergillus glaucus* a partir de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple. Azul de lactofenol, 40x. Descripción: cabezuelas esparcidas y radiadas, uniseriadas. Vesículas esféricas. Conidióforos hialinos de pared delgada. Conidias ovales o equinuladas, hialinas. b. Cultivo de *Aspergillus glaucus*. Agar Sabouraud. Descripción: colonias difusas, planas de color verde, café o gris.<sup>53</sup>



(Universidad de Antioquia, 2016)

### 3.3.3.4 *Aspergillus* Sección *Nigri*

El género *Aspergillus* tiene una considerable importancia para la sociedad debido a la capacidad que presentan algunas de sus especies de producir enzimas y ácidos orgánicos. Sin embargo, algunas especies de *Aspergillus* también produce

deterioro y contaminación de ciertos sustratos alimentarios y sintetizan micotoxinas, entre las que aflatoxinas y ocratoxina A destacan por su importancia

27

*Aspergillus* sección *Nigri* son industrialmente uno de los grupos de hongos filamentosos más importantes, varias cepas pertenecientes a esta sección se utilizan en la industria de la fermentación para la producción de diferentes ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas tales como las amilasas o lipasas, ácidos orgánicos, ácido cítrico y ácido glucónico.<sup>55</sup> ***A. niger*** es una de las especies industrialmente usada bajo determinadas condiciones y considerado en el campo de los alimentos y medicamentos como GRAS (generalmente considerado como seguro).<sup>50</sup>

Ha sido compleja la clasificación e identificación de las especies de este grupo ya que los taxones no solo pueden reconocerse basándose en características fenotípicas.<sup>50</sup>

La taxonomía actual de los *Aspergillus* Sección *Nigri* revela que hay 19 taxones aceptados.<sup>55</sup>

La evaluación taxonómica de este complejo grupo de especies se ha llevado a cabo utilizando diferentes métodos, los cuales están cimentados en estudios genotípicos y moleculares (análisis filogenético de las secuencias de la región ITS de la agrupación de genes rRNA, y partes de los genes beta-tubulina y calmodulina), de polimorfismo del ADN mitocondrial, y técnicas basadas en la PCR.<sup>37</sup> y <sup>50</sup>

Otros aspectos a tener en cuenta para la identificación de los *Aspergillus* Sección *Nigri* se basan en el crecimiento de éstos en medios específicos como Boscald y Agar Sacarosa Creatina. La reacción de Ehrlich, la cual detecta algunos metabolitos secundarios de indol producidos por hongos en reacción directa con el reactivo. Producción de extrolitos y el estudio de los perfiles de ellos. Crecimiento a diferentes Temperaturas. Además las características morfológicas de las colonias y de los conidios a nivel macroscópico y microscópico respectivamente. <sup>50</sup>

Varios nombres de especies bien conocidos como ***A. awamorii***, ***A. usamii***, ***A. phoenicis*** y ***A. ficuum*** se han denominado semejantes.



Con relación a otras especies de *Aspergillus* Sección *Nigri*, la observación filogenética de los datos de la secuencia ITS Muestra que por lo menos 9 especies hacen parte de esta sección: ***Aspergillus heteromorphus***, ***Aspergillus ellipticus***, ***Aspergillus carbonarius***, ***Aspergillus japonicus***, ***Aspergillus aculeatus***, ***Aspergillus Níger***, ***Aspergillus tubingensis***, ***Aspergillus foetidus*** y ***Aspergillus brasiliensis***.<sup>37, 38</sup>

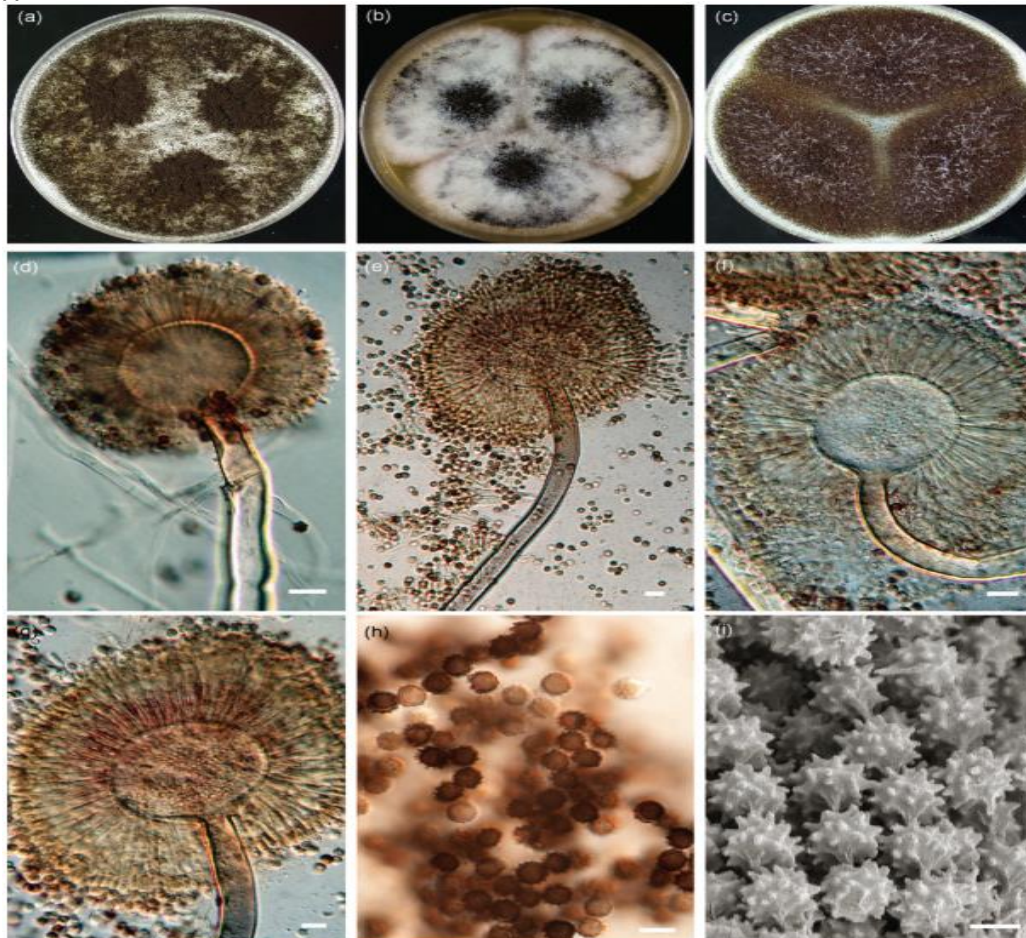
### 3.3.3.5 *Aspergillus brasiliensis*

Una nueva especie, ***A. brasiliensis*** se encuentra dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*. Esta especie se puede diferenciar de otros *Aspergillus* de este grupo por la secuencia de genes b-tubulina y calmodulina por amplificación de fragmentos polimórficos y análisis de los extrolitos que estos producen.<sup>56</sup>

El nombre *brasiliensis* hace referencia a la localidad donde se aisló el cultivo. Sin embargo desde su descubrimiento esta especie también ha sido hallada en otras localidades.<sup>56</sup>

Descripción de ***A. brasiliensis*** según Varga, Frisvad y Samson. (Ver Figura 3-6) Diámetros de las colonias en cada uno de los medios de cultivo utilizados, tales como: autolizados de levadura de Czapek (CYA) a 25 y 37°C, y autolizados de levadura Czapek con agar de NaCl al 5% (CYAS) a 25°C, de 71-76 mm; en agar de autolizados de extracto de malta (MEA) de 52 - 70 mm; en agar extracto de levadura-sacarosa (YES) de 75- 80 mm; agar de avena (OA) de 32-36 mm; agar creatina-sacarosa (CREA) de 32-44 mm, la colonia en principio es de color blanco, luego pasa a marrón oscuro y a negro. El reverso se muestra de color crema a marrón claro. Las cabezas conidiales son globosas al principio y después irradian casualmente desenvolviéndose en varias columnas conidiales; sus paredes son gruesas, lisas y de color marrón claro; Vesículas de 30-45 micras de ancho, casi globosas; biseriada; Métulas cubriendo prácticamente toda la superficie de la vesícula, midiendo 22-30 x 30-6 micras; fiálides en forma de matraces, 7-9 x 3-4 micras; Conidia subglobosa, 3,5-4,8 micras de diámetro, de forma equinulada. No se observaron esclerocios en su morfología.<sup>56</sup>

Figura 3-6. Cultivo de *A. brasiliensis* sp. nov. CBS 101740T. (a). Colonias en CYA; (b). colonias sobre OA; (c). colonias sobre MEA; (d-g). conidióforos; (h). conidios bajo microscopio de luz; (i). conidios como se ve usando SEM. Barras de 10 mm (d-h) y 5 mm (i).<sup>56</sup>



(Varga et al., 2007)

### 3.3.4 Medida del crecimiento de Microorganismos

El crecimiento de una población de microorganismos puede ser considerado desde aspectos diferentes y de acuerdo a éstos se puede llegar a estimar la medida del crecimiento mediante distintas metodologías. El crecimiento puede entenderse como la capacidad que tienen las células individuales para reproducirse, y completar una división celular. De esa forma, se define a los microorganismos como partículas discretas y el crecimiento es interpretado como

un aumento en el número total de dichas partículas. Existen varias maneras de determinar el número total de microorganismos en una muestra: Determinación del número de microorganismos, Determinación de la masa celular, y determinación de la actividad celular. <sup>10</sup>

Indistintamente de los métodos utilizados para el conteo de microorganismos estos se pueden clasificar en dos modalidades definidas, los métodos de recuento directo o cuantitativos y los indirectos o cualitativos, que a través de la valoración de varios factores permite correlacionar la medida de los mismos con un número determinado de microorganismos. <sup>10</sup>

Para estimar el número de microorganismos o la concentración de estos, se pueden emplear ser métodos indirectos como el Recuento en placa ya sea en superficie (inoculando 0.1ml) o por profundidad (inoculando 1 ml), Método del Número Más Probable, Filtración por membrana, o métodos directos como Recuento directo al microscopio, ya sea en frotis o en cámaras, Conteo al microscopio de membranas, Conteo electrónico de partículas (tipo Coulter), Recuento proporcional de Wright. <sup>10</sup>

#### **3.3.4.1 Recuento de esporas de hongos por conteo directo al Microscopio en Cámara de Neubauer**

Toda experiencia o ensayo en el que se labore con células requiere que estas células estén cuantificadas. Para cuantificar las células de una suspensión celular existen diversos métodos. Uno de los métodos más utilizados por ser sencillo y económico, es la observación microscópica directa y el recuento de células en cámaras de recuento celular o hematocitómetros. <sup>19</sup>

Mayormente las cámaras de conteo directo al microscopio tienden a presentar el mismo modelo de construcción, estas cámaras se definen como una placa de base rectangular y gruesa de vidrio óptico, del tamaño de un porta-objetos. Las ranuras fresadas en la superficie de la placa base la dividen en dos zonas anchas exteriores y tres campos pequeños interiores. La superficie del puente central es más profunda que los dos puentes exteriores. En el puente central (fondo de la cámara) están grabadas las cuadrículas de conteo. <sup>23</sup>

En el campo central a lo que se le conoce como fondo de la cámara, las dos cuadrículas de recuento se encuentran separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central suele ser de 0,1 mm más bajo (profundidad cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central y cubreobjetos ya situado existe por tanto una ranura de 0,1 mm. La restricción lateral del volumen a contar se forma mediante las superficies imaginadas por la proyección vertical sobre las líneas exteriores de la cuadrícula de recuento. <sup>23</sup>

## 4 METODOLOGÍA

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio Microbiológico de Barranquilla ubicado en Vía 40 No. 76 – 206.

### 4.1 Trazabilidad de cepas (material de referencia)

#### 4.1.1 Cepa de Referencia

En esta experiencia se empleó la Cepa (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) Número de catálogo 0392, Número de lote 392-462 adquirida de una colección reconocida, la cual cuenta con su correspondiente certificado de origen. (Anexo 1)

### 4.2 Materiales y reactivos

- Cajas de Petri (90x15 mm)
- Puntas azules y Amarillas de 10-1000 µl
- Cubre objetos
- Porta objetos
- Cámara Improved Neubauer(1/10 mm) Marca Boecco Germany
- Tubos de Ensayo tapa rosca de vidrio
- Gasa
- Cinta pegante
- KWIK-STIK™
- Asa bacteriológica redonda y recta de punta

- Agua destilada estéril
- Solución salina (NaCl) al (0,85 % p/v)
- Solución Tween 80 al (0.1 %)
- Azul de Lactofenol
- Agar Plate Count (PC) de Merck
- Agar extracto de levadura- glucosa- Cloranfenicol (YGC) de Merck
- Agar–dextrosa 4% Sabouraud de Merck
- Agar PDA (Papa Dextrosa) de Oxoid

#### **4.3 Equipos e instrumentos utilizados**

- Incubadora Challenger #231 25° C ±1
- Autoclave Tuttnauer
- Micropipeta 100-1000 µL
- Agitador vortex
- Balanza de precisión
- Cabina de Bioseguridad Clase II tipo A #421 Marca Esco
- SchakerMarcaEsco
- Microscopio Óptico Marca Nikon

#### 4.4 Control de ambientes de las cabinas de flujo laminar

Para determinación de aerobios mesófilos y hongos filamentosos y levaduras, como microorganismos indicadores de contaminación ambiental, se realizó un control a la cabina de flujo laminar de bioseguridad de clase II, donde se llevó a cabo la estandarización del Inóculo. Dos cajas de Petri tamaño (90x15 mm) con medios de cultivo Agar extracto de levadura- glucosa- Cloranfenicol (YGC) para identificación de hongos filamentosos y levaduras, y Agar Plate Count (PC) para Aerobios Mesófilos, se exponen dentro de la cabina, retirando sus tapas, por un tiempo de 15 minutos, donde previamente ha sido sometida la cabina a una limpieza con solución Tego al 2% por un tiempo de 15 minutos, y a exposición de luz ultra violeta por 5 minutos. En el tiempo de exposición de las cajas, la cabina es encendida para que circule el flujo de aire que descontamina el ambiente. Las cajas se incuban, en Agar YGC a una temperatura y tiempo de incubación 25°C +/- 1 por 5 días y en Agar PC a 35°C +/- 0.5 por 2 días. Transcurrido ambos tiempos de incubación se reportaron los recuentos en una planilla de registros diarios de control de cabinas de flujo laminar. <sup>15</sup> (Anexo 2)

#### 4.5 Reactivación de *Aspergillus brasiliensis*

De un KWIK-STIK <sup>TM</sup> que contenía el cultivo Fúngico, se sembró masivamente el *A. brasiliensis* ATCC 16404 En medios de cultivos, YGC (Agar extracto de levadura- glucosa- Cloranfenicol) y el Agar Sabouraud-Dextrosa 4% a pH 6.6 y 5.6 respectivamente, como lo sugiere la casa comercial de donde fueron adquiridos (MERCK) <sup>21</sup> y en Agar PDA (Papa Dextrosa) a pH 3.5 (sugerido por Oxoid). <sup>54</sup> Los dos medios de cultivo YGC y Sabouraud también se usaron ajustando su pH a 5.0, ya que a este pH crecen mejor los hongos filamentosos. <sup>49</sup> Todo lo anterior descrito, con el fin de determinar en qué medio y bajo que pH el hongo mostraba un buen crecimiento pero sobre todo una eficaz esporulación, y así escoger la condición y el medio indicado para los siguientes ensayos. Los medios se incubaron a temperatura y tiempo de incubación de 25°C +/- 1. Se tomó de cada medio de cultivo una placa control, para verificación de que éstos se encontraran libres de contaminación. <sup>14</sup>

#### 4.5.1 Uso de los Dispositivos KWIK-STIK™

Los dispositivos KWIK-STIK™ contienen un gránulo liofilizado de una sola cepa de microorganismo o una población mixta definida de microorganismos y su uso es de gran importancia en las pruebas de diagnósticos microbiológicos.<sup>46</sup>

En primera instancia se abrió la bolsa en el corte y se removió el KWIK-STIK™. Se adjuntó la etiqueta del rótulo a los registros de ingresos de cepas que se encuentran en el laboratorio y se liberó el fluido hidratante en el medio de cultivo para realizar la siembra por superficie usando un asa estéril facilitando el aislamiento de las colonias. Se eliminó el KWIK-STIK™ en el lugar apropiado para materiales biológicos peligrosos,<sup>35</sup> e inmediatamente se incubó cada medio de cultivo inoculado, a una temperatura de 25°C +/- 1 por un tiempo de 7 días.<sup>46</sup>

#### 4.6 Concentración de esporas

##### 4.6.1 Ajuste del Inóculo

Luego de transcurridos los días de incubación se realizó la estandarización del Inóculo preparando una solución de esporas en un medio salino fisiológico con el agente surfactante (Twen 80) y se ajustó hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml.<sup>46</sup>

##### 4.6.2 Preparación de la solución de recolección de esporas

De la formulación comercial de Tween 80, se hizo una dilución al 10% tomando 10 ml de ésta, se le agregó 90 ml de agua destilada, y se mantuvo en stock en refrigeración (10°C). Para la preparación del Tween 80 al 0.1%, se tomó 1 ml de la solución al 10% y se agregó 99 ml de agua destilada. Finalmente se preparó la solución donde fueron recolectadas las esporas con NaCl (0,85 % p/v) y Tween 80 (0,1 % p/v). Esta solución se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos. Una vez fría la solución se tomó 20 ml de ésta y se adicionaron a la caja con crecimiento monospórico de *A. brasiliensis* quiere decir que los



aislamientos de las esporas se hicieron a partir de una colonia del microorganismo, para establecer una colección confiable de las esporas, garantizando la autenticidad y pureza de las mismas y de los datos que se consigan. El raspado de las esporas fue transferido a la solución en un tubo estéril y se agitó en un shaker (agitador orbital), a 190 rpm (revoluciones por minuto) por un espacio de 15 segundos, para que se separaran todas las esporas. <sup>12</sup>

### 4.6.3 Conteo en Cámara de Neubauer

#### 4.6.3.1 Cálculo de la medida de la concentración

Se realiza aplicando una fórmula matemática universalmente aceptada. La distribución de las células y/o partículas en la cuadrícula debe ser homogénea. La concentración de las células y partículas en cada cuadrante pequeño no debe ser inferior a 10 y no mayor a 30, de esta forma, es como se determina la dilución (en caso de haberse realizado diluciones), la solución o dilución no debe tener una concentración mayor a  $10^6$ . Todos los conteos deben realizarse por duplicado y no debe haber diferencias significativas entre los conteos obtenidos. <sup>23</sup>

$$\text{Partículas por } \mu\text{l volumen} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Superf. cont. (mm)}^2 \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}$$

Donde Las partículas contadas son la sumatoria de las células, conidios o esporas contadas en los cuadrados medianos escogidos (5 son un número de cuadrados medianos significativos, o pueden ser más). <sup>23</sup>

La superficie de conteo, es la superficie en  $\text{mm}^2$  contada y está supeditado al número de cuadrados medianos escogidos multiplicado por 16, que es el número de cuadrados pequeños que constituye cada uno de estos y por  $0,0025 \text{ mm}^2$  que es la superficie de cada una de estos cuadrados pequeños (sus aristas son de  $0,05 \text{ mm}$ ). La profundidad es estándar y es de  $0,1 \text{ mm}$ . La dilución se puede establecer como el valor nominal inverso o el valor de proporcionalidad de la dilución, donde, por ejemplo,  $10^{-1}$  es  $0,1$  o  $1/10$ . <sup>23</sup>

#### **4.6.3.2 Ajuste de Inóculo**

Se tomó una alícuota (0.01 ml) de el filtrado de esporas, y se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer observando por microscopía óptica en 40X <sup>18</sup>, El tamaño del Inóculo se ajustó a  $1.0 \times 10^6$  esporas/ ml mediante la enumeración microscópica en cámara de Neubauer.<sup>33</sup> El conteo se realizó por triplicado en tres ensayos distintos.

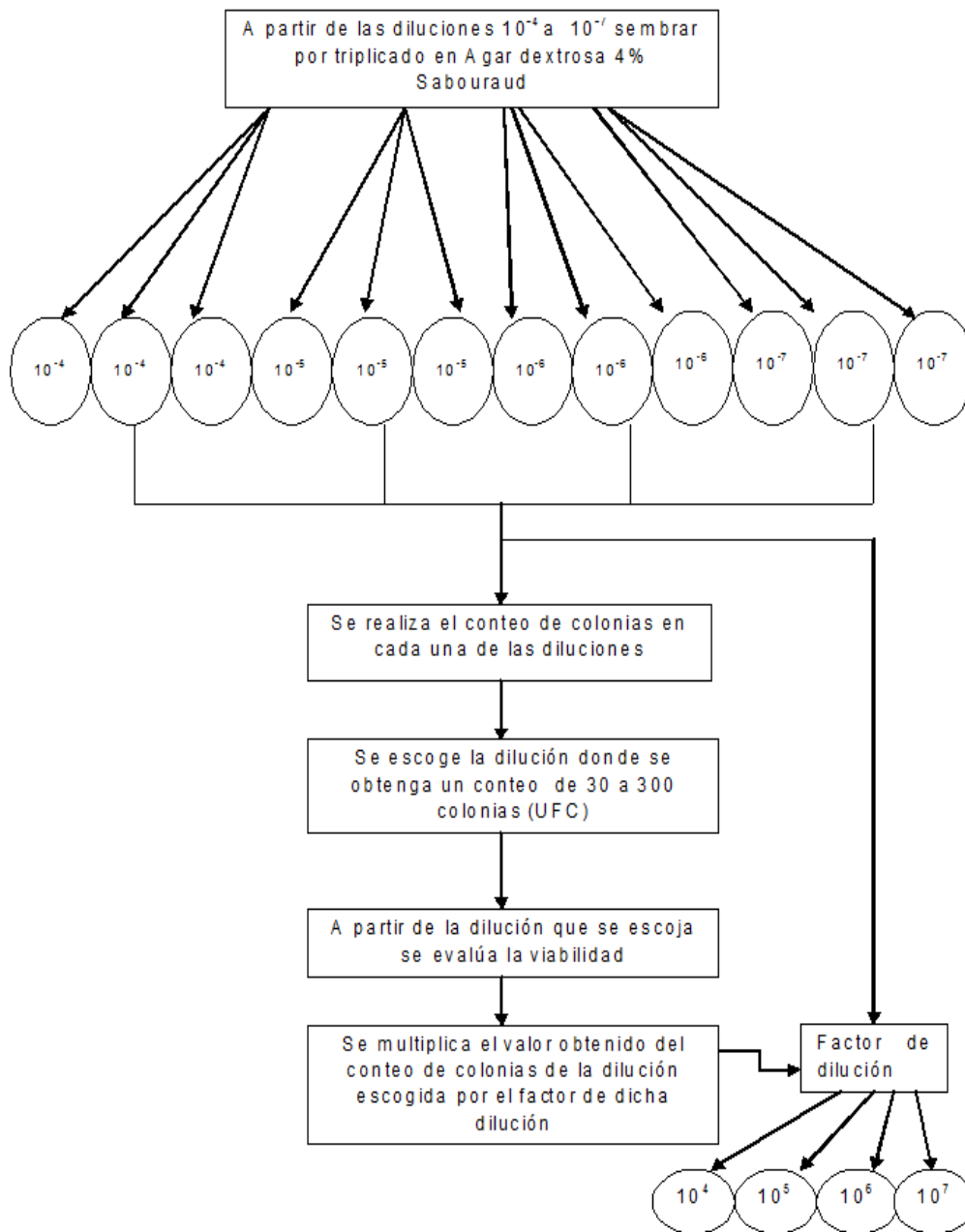
#### **4.7 Recuento en placa**

A partir de la solución de esporas previamente ajustada, se realizó diluciones hasta  $10^{-7}$  de las cuales se tomó las diluciones  $10^{-4}$  –  $10^{-7}$  y se sembró por triplicado en Agar Sabouraud–Dextrosa a 4%. Las cajas inoculadas se incubaron a 25°C +/- 1 por 5 días. Las colonias se contaron tan pronto como fuese posible después de la observación del crecimiento visible, <sup>21</sup> haciendo un seguimiento cada 18-24-48-72 horas.

#### **4.8 Viabilidad**

Del conteo de colonias en cada una de las cajas sembradas por triplicado en Agar–Dextrosa 4% Sabouraud a partir de las diluciones  $10^{-4}$  –  $10^{-7}$ , se determinó la dilución donde se encontraron las colonias en un rango de 30-300 UFC/ml, y con base al recuento de colonias en la caja correspondiente, el valor del conteo se multiplicó por el factor de dilución como se observa en la Figura 4-1.<sup>13, 14</sup>

Figura 4-1. Diagrama de flujo del procedimiento para hallar viabilidad de *A. brasiliensis*.



(Cárdenas, 2014)

## **4.9 Pureza**

Para la identificación se tuvo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas, con el fin de confrontar con la literatura. (Según lo propuesto por Varga, Frisvad y Samson en el Año 2007).<sup>56</sup>

### **4.9.1 Caracterización microscópica**

Para la descripción del hongo mediante una observación microscópica de sus estructuras, se realizó una tinción o coloración, donde a partir del crecimiento del moho en Agar Sabouraud–Dextrosa 4% a 25°C +/- 1 <sup>21</sup> por un tiempo de 15 días, se tomó una pequeña muestra del tejido hifal y se dispersó en un portaobjetos con una gota del colorante azul de lactofenol y se le colocó un cubre objeto. Se observó la placa en el microscopio óptico a 40X. <sup>12</sup>

### **4.9.2 Caracterización macroscópica**

Esta caracterización se basó en la descripción de la colonia. Con un asa de siembra, se tocó ligeramente el hongo a propagar y se sembró por punción en ángulo recto en el centro de la placa–dextrosa 4% Sabouraud. 25°C +/- 1 por un tiempo de 15 días <sup>12,21</sup> Se Observó la forma de crecimiento de la colonia, tamaño (el cual se midió de lado a lado pasando por el centro en dos puntos de la colonia), aspecto, textura y coloración de ambas caras y la producción de pigmentos. <sup>12</sup>

## **4.10 Parámetros estadísticos basados en la guía técnica colombiana gtc 84 (modelos matemáticos de variación). <sup>28,7</sup>**

Con la ayuda del programa Microsoft Excel, a partir de todos los datos obtenidos en cada uno de los 3 ensayos realizados se determinó el Promedio, la Desviación Estándar, el Coeficiente de Variación y el nivel de confianza (límite inferior y superior).<sup>7</sup>

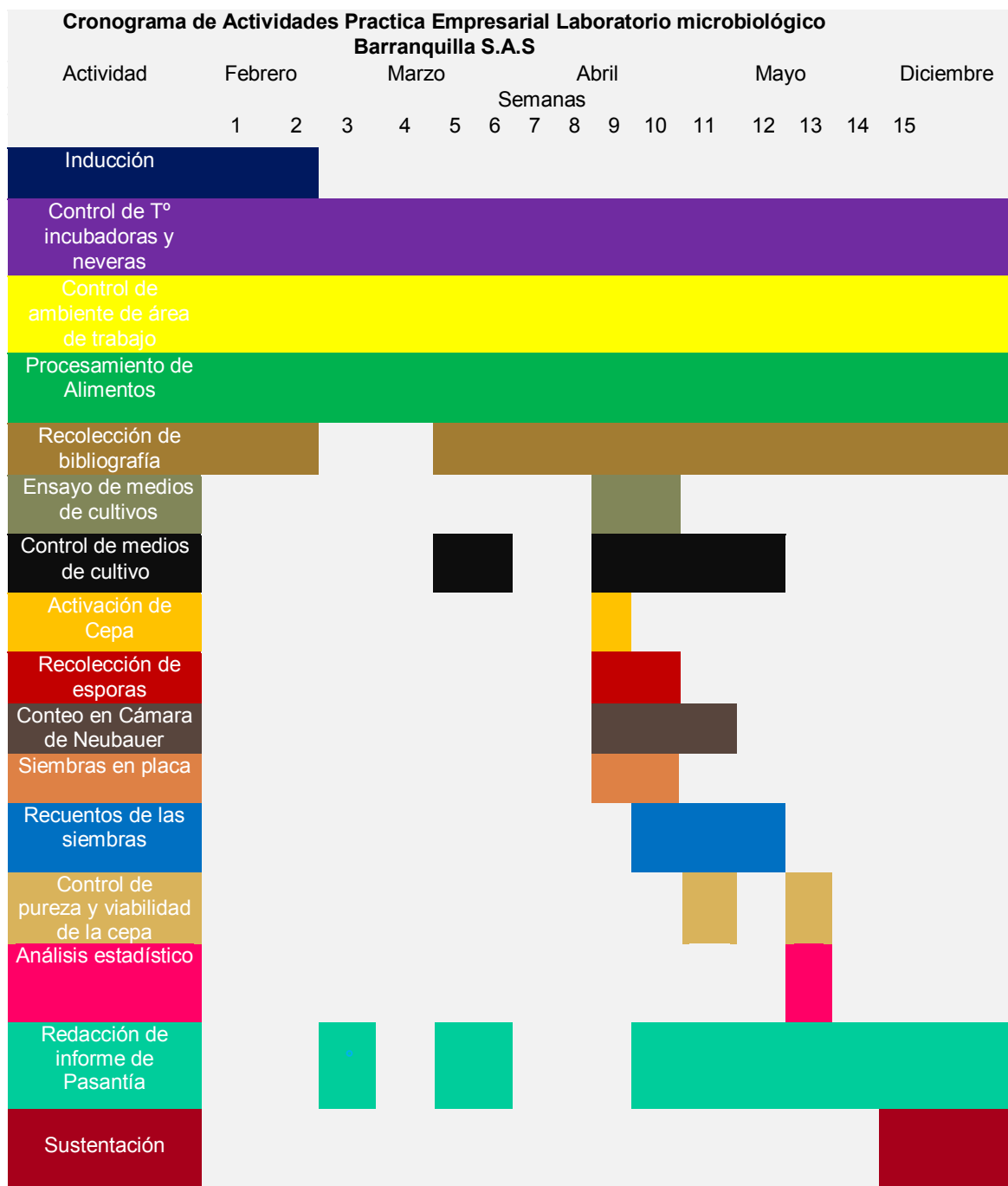
La Media Aritmética de los resultados es un parámetro que muestra el promedio de los datos en los experimentos.<sup>52</sup> El coeficiente de variación es una medida de la dispersión relativa de los datos, y se define como la desviación estándar de la muestra formulada como porcentaje de la media, es de utilidad para comparar la dispersión entre variables con distintas unidades de medidas, ya que el coeficiente de variación, difiere de la desviación estándar, siendo independiente de la unidad de medida de la variable de estudio.<sup>22</sup> La principal medida de dispersión, es la varianza, o su raíz cuadrada, la desviación estándar. Un alto valor de la varianza indica que los datos están muy alejados del promedio.<sup>22</sup> Otro parámetro estadístico a tener en cuenta es el intervalo de confianza, dentro del cual los valores no pueden diferir estadísticamente unos de otros. Éstos están sujetos por lo general a un nivel de confiabilidad de 95%.<sup>17</sup> Atendiendo a estos parámetros se determinó de manera específica, ese nivel de confianza en los datos experimentales obtenidos durante la estandarización del Inóculo de *A. brasiliensis*.

#### **4.11 Porcentaje de Recuperación de las Esporas de *A. brasiliensis***

El porcentaje de concordancia entre conteo en cámara de Neubauer y recuento en placa se realizó por un porcentaje de recuperación estimado a partir de la viabilidad de las colonias obtenidas de la dilución correspondiente sembrada en Agar Sabouraud-Dextrosa 4%, teniendo en cuenta que la dilución correcta debe presentar un conteo de colonias en un rango de 30-300 UFC/ml.

## 5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

**Tabla 5-1. Cronograma de actividades realizadas durante el desarrollo de la práctica empresarial en LABORATORIO MICROBIOLÓGICO BARRANQUILLA S.A.S.**



(Triana, 2016)

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Control de ambiente de la cabina de Flujo laminar

Los Recuentos de Aerobios mesófilos y hongos filamentosos y levaduras en cada uno de los controles de ambientes realizados a la cabina de flujo laminar de Bioseguridad Clase II, en los distintos ensayos, fue de 0 UFC para ambos microorganismos. (Anexo 2). Lo cual indica un eficiente proceso de limpieza y desinfección realizado a la cabina, siendo seguro el flujo circulante suministrado dentro de ella durante la estandarización, teniendo en cuenta que este primer paso es de vital importancia ya que la contaminación del ambiente puede ser un vector de microorganismos patógenos y alterantes interferentes que pueden afectar en la precisión de los resultados.

### 6.2 Reactivación de *A. brasiliensis*

Los medios de cultivo para el crecimiento de *A. brasiliensis* ATCC 16404 sugeridos por la ATCC, para su óptimo crecimiento, son el Agar extracto de malta, el Agar Sabouraud y PDA <sup>6</sup> más hay que tener presente que no es tan importante que el hongo tenga un buen crecimiento (hifas vegetativas), sino que esporule (hifas aéreas= conidióforos), por tanto lo que se buscaba era un buen medio de esporulación más que un medio de crecimiento.

Es necesario decir que la germinación de las esporas es facilitada por las condiciones fisiológicas suministradas, siendo que durante este proceso existe un incremento en la tasa metabólica que convierte la espora que está en estado adormecido a un estado de crecimiento activo, dando lugar a la síntesis de macromoléculas como (ADN, ARN, Proteínas, Carbohidratos y lípidos), exponiendo que, la traducción a proteínas se dará de manera inmediata después que las esporas hayan sido puestas a crecer en los medios adecuados. <sup>4</sup>

El medio de cultivo YGC es óptimo para el desarrollo de levaduras <sup>36</sup> y puede permitir el crecimiento de algunos otros organismos fúngicos, pero no fue apto para facilitar un crecimiento y esporulación adecuada de *A. brasiliensis* (obteniendo una concentración de 1.0- 1.1 x 10<sup>4</sup> esporas/ml), de hecho en Agar

Sabouraud **A. brasiliensis** esporula bien a partir de los 5 primeros días de incubación y crece favorablemente (sobre todo a pH 5) pero no se mostró lo suficientemente esporulado (obteniendo una concentración entre  $1.5 - 2.2 \times 10^4$  esporas/ml) como para generar un elevado número de conidios, que era lo que se deseaba (Triana, 2016), (Ver Figuras 6-1 y 6-2). Ciertos aspectos son relevantes frente a esto, como los sustratos presentes en los medios de cultivo, ya que ellos ejercen una influencia en el crecimiento y la esporulación de los microorganismos.

8

Los hongos generalmente crecen mejor en un medio rico en carbohidratos. <sup>8</sup> Algunos medios de cultivo son más favorables para la esporulación de los hongos por tener carbohidratos complejos siendo habitualmente menos apropiados para la producción de hifas vegetativas y más adecuados para la producción de esporas y/o conidios. <sup>8</sup> Este puede resultar ser uno de los primeros inconvenientes a la hora de preparar Inóculo de hongos filamentosos, como lo sucedido en esta experiencia, ya que en un inicio a la hora de realizar el raspado de las cajas de los medios de cultivo YGC y Sabouraud para la obtención de las esporas, no se observaba un conteo significativo de ellas por conteo en cámara de Neubauer, lo cual permitió sugerir el uso de un medio de cultivo como PDA, que accediera, dentro de las condiciones de crecimiento suministradas a **A. brasiliensis**, a una eficaz esporulación (Ver Figura 6-1.d). Se trae a colación que el medio de cultivo PDA es útil para inducir la esporulación de los **Aspergillus**. <sup>53</sup> y que es un medio de cultivo muy usado para estudios de esporulación de hongos. <sup>12</sup>

Otro estudio como el de Aguirre (2006), sugiere que para potencializar el efecto inductor de los sustratos de carbono en la esporulación, se adicione una fuente de nitrógeno, ya que *“el microorganismo puede germinar con las fuentes de carbono, pero requiere más tiempo que cuando se le suministra una fuente exógena de nitrógeno. Esto posiblemente se debe a que el hongo se ve obligado a usar reservas endógenas de aminoácidos esenciales para iniciar la formación del tubo germinal al no encontrarlos disponibles en el medio de cultivo.”* <sup>4</sup> Siendo que una fuente de nitrógeno propicia los sucesos con los que se da inicio a la germinación, probablemente porque para llevarse a cabo la síntesis de proteínas se necesitan aminoácidos. <sup>4</sup>

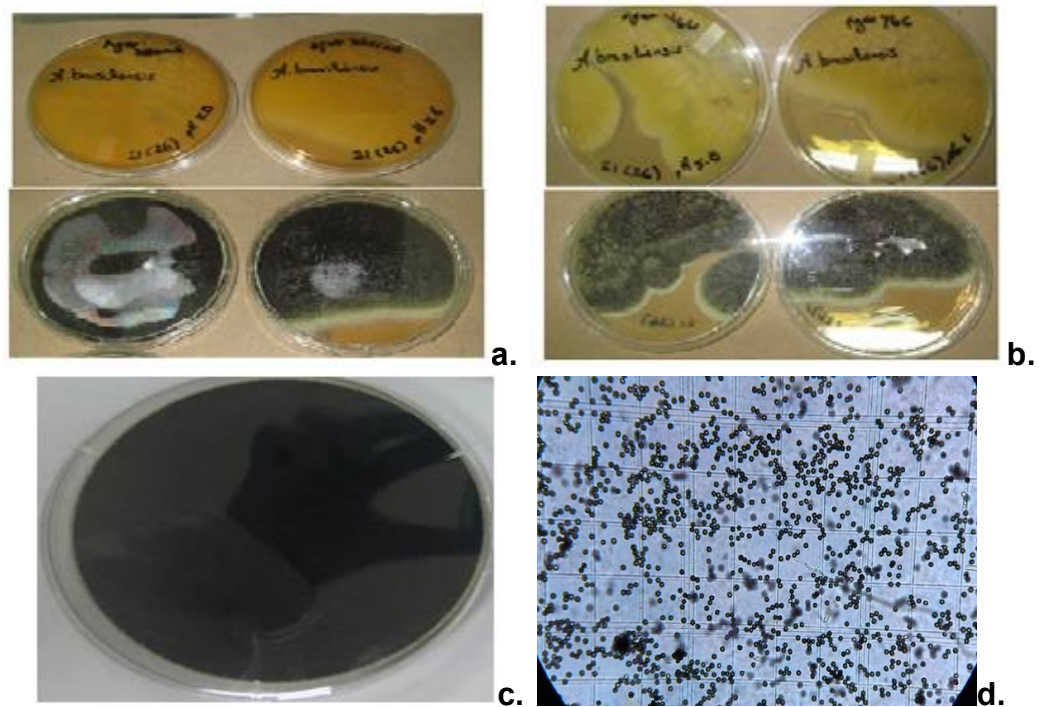
En cuanto al pH se observó que en (YGC) a pH 6.6 se obtuvo una concentración de esporas/ml de  $1.0 \times 10^4$  y a pH 5.0 de  $1.1 \times 10^4$ , y en agar Sabouraud – Dextrosa 4% a pH 5.6 de  $1.5 \times 10^4$  y a pH 5.0 de  $2.2 \times 10^4$ . Por tanto cada medio de cultivo no muestra que a un pH se obtuviese una concentración mayor relevante de



esporas con respecto a otro pH. Siendo que en PDA se utilizó el medio de cultivo a pH sugerido por la literatura, ósea a un solo pH. Esto puede ser porque cada pH estudiado está en el rango de pH óptimo para la germinación de los hongos filamentosos, el cual no debe sobre pasar un pH de 7. (Ver Figuras 6-1 y 6-2).

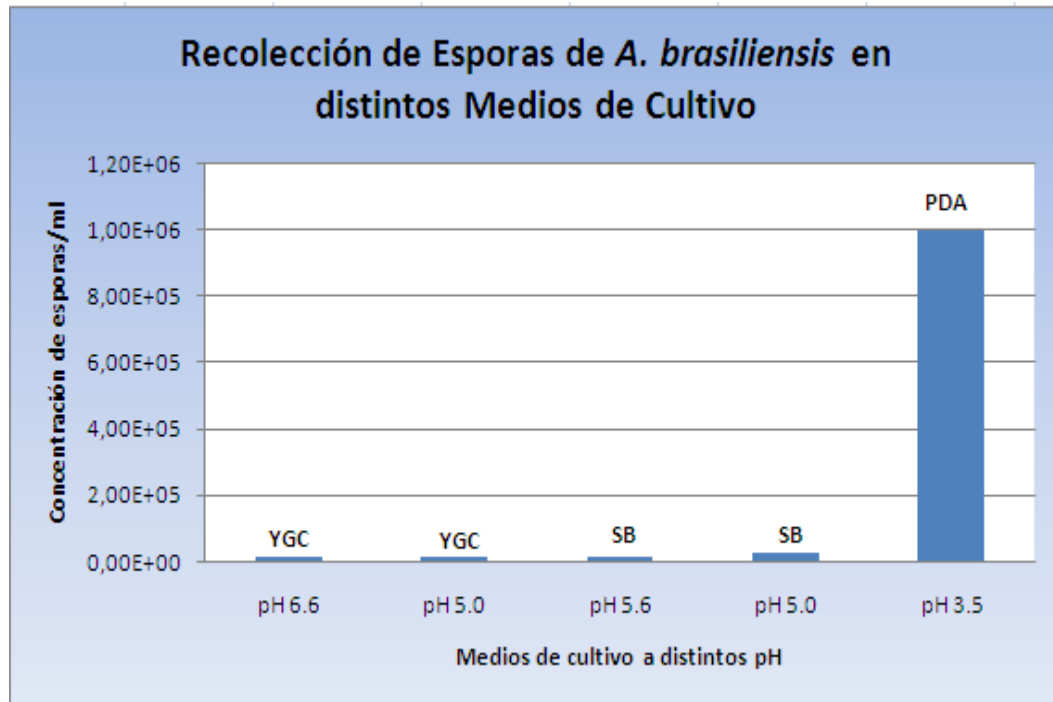
A partir del medio de cultivo Agar Papa dextrosa a pH 3.5 tuvo un buen crecimiento el hongo y lo más importante, una efectiva colecta de las esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/ml). Por lo tanto de este medio de cultivo se llevó a cabo el raspado para la preparación de la solución, con el fin posterior de estandarizar el Inóculo de *A. brasiliensis*. (Ver Figuras 6-1 y 6-2).

Figura 6-1. a. Crecimiento de *A. brasiliensis* en Agar–dextrosa 4% Sabouraud a pH 5.0 (A lado izquierdo) y 5.6 (A lado derecho). b. Crecimiento de *A. brasiliensis* en Agar YGC a pH 5.0 (A lado izquierdo) y 6.6. (A lado derecho). c. Crecimiento de *A. brasiliensis* en Agar PDA a pH 3.5 d. Observación microscópica con objetivo de 40X en cámara de Neubauer de esporas de *A. brasiliensis* de una solución realizada a partir de crecimiento del hongo en Agar– Papa Dextrosa.



(Triana, 2016)

Figura 6-2. Recolección de las esporas en 3 medios de cultivo a distintos pH. YGC (Agar extracto de levadura- glucosa- Cloranfenicol), SB (Agar-Dextrosa 4% Sabouraud), PDA (Papa-Dextrosa).



(Triana, 2016)

### 6.3 Concentración de esporas

#### 6.3.1 Conteo en Cámara de Neubauer y Ajuste del Inóculo de *Aspergillus brasiliensis*.

Para conteo en un hematocitómetro existen varios requisitos que se deben cumplir por la especificidad de las características que estructuran la cámara. <sup>29</sup>

Para el ajuste del Inóculo de *A. brasiliensis*, por conteo en cámara de Neubauer, fue necesario realizar una dilución de la suspensión inicial por motivo de una concentración elevada de esporas en la suspensión, teniendo en cuenta que un

conteo adecuado no debe superar los límites establecidos ( $2.5 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$  células o esporas / ml), <sup>29</sup> por tanto un conteo significativo de esporas se obtuvo en la dilución  $10^{-1}$ , estableciendo un criterio de conteo promedio por cuadrado pequeño, que cumpliera con lo sugerido por la literatura, la cual aclara el hecho de que para escoger la dilución correcta, los contajes de las esporas no deben estar por debajo de 10 ni por encima de 30 (en cada uno de 16 cuadrados pequeños de los 5 cuadrados medianos contados) <sup>23</sup>. Entonces si observamos en la Tabla 6-1

**Tabla 6-1. Recuento de esporas de *A. brasiliensis* partiendo de la dilución  $10^{-1}$ , en 5 cuadrados de los 25 medianos de la cámara de Neubauer establecidos para contaje de estructuras asexuales reproductivas de hongos. Tres ensayos distintos c/u por triplicado.**

<b>CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER</b>						
<b>Fechas de Ensayo</b>	<b>Triplicado</b>	<b>Conteo de esporas en 5 cuadrantes (Dilución <math>10^{-1}</math>)</b>				
<b>30/04/2016</b>	<b>1</b>	404	399	411	386	401
	<b>2</b>	394	403	401	405	409
	<b>3</b>	413	409	412	375	402
<b>05/05/2016</b>	<b>1</b>	464	368	432	400	400
	<b>2</b>	528	456	432	507	352
	<b>3</b>	496	480	352	482	448
<b>05/05/2016</b>	<b>1</b>	432	496	512	448	352
	<b>2</b>	496	336	384	480	384
	<b>3</b>	400	464	368	384	464
<b>Promedio</b>	<b>Total 9</b>	<b>447</b>	<b>423</b>	<b>412</b>	<b>430</b>	<b>401</b>

(Triana, 2016)

se puede inferir que para cada uno de los cuadrados contados, (5 medianos de 25), lo cual es representativo, se realizó un conteo de esporas promedio entre 401-447 el cual matemáticamente no está por debajo de 10 ( $10 \times 16$  cuadrados pequeños = 160) ni por encima de 30 ( $30 \times 16$  cuadrados pequeños = 480), y que al ser multiplicado por el volumen de la cámara, que es de  $1 \times 10^4$  y por la dilución realizada ( $10^{-1}$  o 0,1) arroja una concentración promedio de  $1.0 \times 10^6$  esporas/ml para el ajuste del Inóculo, como es apreciado a continuación en la Tabla 6-2.

Tabla 6-2. Ajuste del Inóculo de *A. brasiliensis*. Conteo de esporas a partir de la dilución  $10^{-1}$  por triplicado durante tres distintos ensayos. Resultado obtenido aplicando la fórmula establecida para determinar la concentración por conteo en un Hematocímetro.<sup>23</sup>

<b>AJUSTE DEL INÓCULO DE <i>Aspergillus brasiliensis</i></b>		
<b>Fechas de Ensayo</b>	<b>Triplicado</b>	<b><math>10^{-1}</math> esporas/ml</b>
<b>30/04/2016</b>	<b>1</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
	<b>2</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
	<b>3</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
<b>05/05/2016</b>	<b>1</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
	<b>2</b>	<b><math>1,1 \times 10^6</math></b>
	<b>3</b>	<b><math>1,1 \times 10^6</math></b>
<b>05/05/2016</b>	<b>1</b>	<b><math>1,1 \times 10^6</math></b>
	<b>2</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
	<b>3</b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>
<b>Promedio de los 3 ensayos</b>	<b>Total 9</b>	<b><math>1.0 \times 10^6</math></b>

(Triana, 2016)

El ajuste del Inóculo de *A. brasiliensis* en una concentración de  $1.0 \times 10^6$  esporas/ml como se observa en la Tabla 6-2, por método de conteo en Cámara de Neubauer. Esto tan solo es una cuantificación probable de lo que se ha preparado, ya que en esta solución podemos encontrar esporas viables y no viables, siendo importante denotar que además este método de conteo directo puede generar errores en un promedio del 20 al 30% por pipeteo, toma de volumen y homogenización inadecuada<sup>29</sup> sugiriendo también cierta subjetividad dependiente de la observación del operador, aunque bien, independiente del color y del tamaño de los conidios,<sup>32</sup> por ello se valoró la concentración ya establecida por conteo en cámara de Neubauer utilizando recuento en placa, para realizar la estandarización, a partir de lo que se obtuviese en UFC/ml. Como se especifica a continuación.

## 6.4 Recuento en placa

El contaje de UFC en cultivo es un procedimiento que puede estar sujeto a muchas variables en su realización, entre ellas la ejecución de la suspensión del Inóculo y el volumen a colocar en las placas para proceder posteriormente a la siembra por agotamiento del Inóculo diluido <sup>32</sup> Sin embargo los resultados de los recuentos, como podemos observar en la Tabla 6-3 muestran que en primer lugar si hubo una disminución en una unidad logarítmica entre recuento y recuento con respecto a cada una de las diluciones, por lo tanto se habrá cumplido con el principio de que a medida que la solución es diluida cada 10 veces, la concentración de los organismos presentes disminuye, dicho principio es de suma importancia para establecer, a partir de que dilución es posible realizar el conteo, y hasta que dilución se observa crecimiento del microorganismo, y así poder estandarizar el Inóculo a partir de la viabilidad de sus esporas cultivables recuperadas en placa, lo cual se observa más adelante.

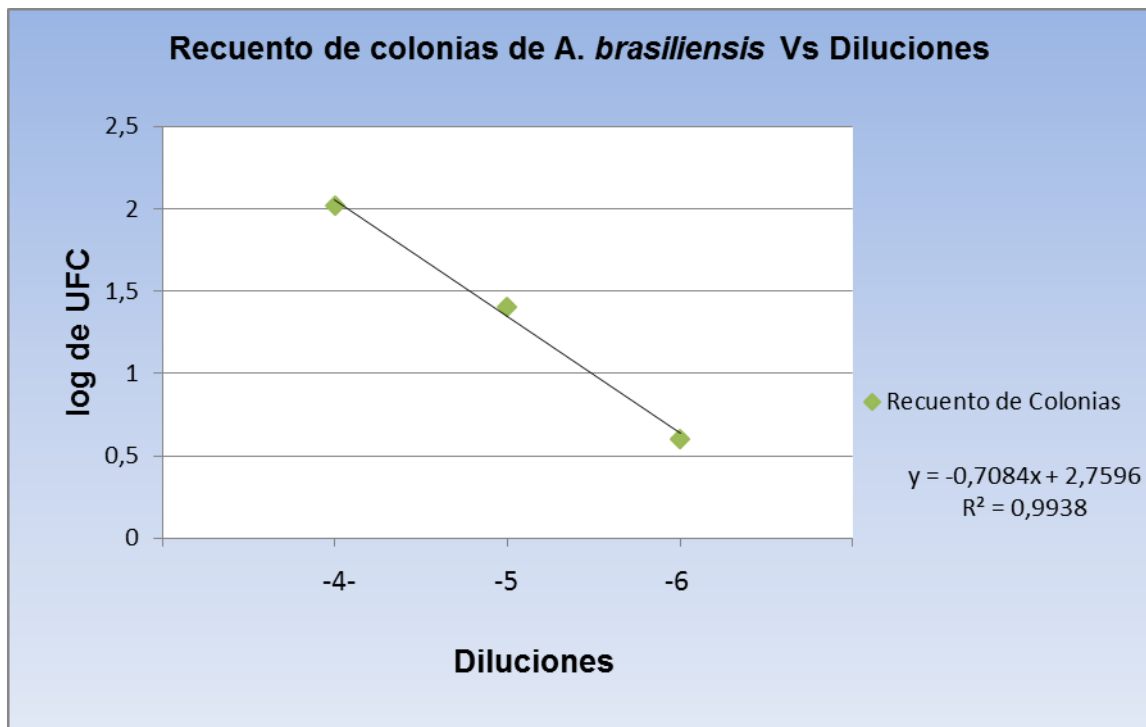
Tabla 6-3. Recuento y promedio de las colonias de *A. brasiliensis* durante los tres distintos ensayos luego de transcurrido los 7 días de incubación. Sembrado por triplicado, por superficie (0,1 ml), en Agar Sabouraud 4% dextrosa, de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ , a partir del Inóculo del *A. brasiliensis* ajustado a una concentración de  $1,0 \times 10^6$  esporas/ml. (Anexo 3).

RECuento DE DE COLONIAS DE <i>Aspergillus brasiliensis</i> EN AGAR SABOURAUD					
Fechas de Ensayo	Triplicado	Diluciones			
		$10^{-4}$ UFC	$10^{-5}$ UFC	$10^{-6}$ UFC	$10^{-7}$ UFC
2016/05/07	1	101	27	4	0
	2	111	26	4	0
	3	103	29	6	0
2016/05/12	1	96	23	3	0
	2	105	22	3	0
	3	110	29	1	0
2016/05/12	1	104	24	4	0
	2	102	24	5	0
	3	108	26	3	0

(Triana, 2016)

De igual forma, con la finalidad de establecer si el comportamiento de la estandarización seguía una tendencia, se realizó el gráfico de la concentración vs dilución, con los valores de los recuentos de las colonias en cada una de las diluciones, para obtener una función lo más cercana a la distribución normal, observándose que siguen una tendencia exponencial y lineal con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.9938 lo cual nos indica que la variación que presenta el conteo de las colonias tiene una gran dependencia de la variación de la dilución empleada. Figura 6-3. Ver Anexo 4.

**Figura 6-3 Gráfico lineal del logaritmo de los Recuento de colonias de *A. brasiliensis* en Agar Sabouraud-Dextrosa 4% vs Diluciones ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ).**



(Triana, 2016)

## 6.5. Viabilidad

La supervivencia de los hongos depende de la capacidad que tienen éstos para producir grandes cantidades de esporas viables bajo diferentes condiciones ambientales.<sup>4</sup>

La prueba de viabilidad es muy importante, ya que de este proceso depende en gran manera determinar si los hongos están llevando a cabo procesos vitales tales como la germinación, formación de estructuras, y reproducción. <sup>33</sup>

La viabilidad de *A. brasiliensis*, como se logra apreciar en la tabla 6-4, se obtuvo a partir del recuento en la dilución donde pudo contarse entre un rango de 30-300 colonias ( $10^{-4}$ ), donde cada dato es multiplicado por el factor de la dilución, <sup>28</sup> pudiendo observar en las siguientes diluciones ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ ) un crecimiento por debajo de este rango. Por tanto la Viabilidad de *A. brasiliensis* es de  $1.0 \times 10^6$ .

**Tabla 6-4. Viabilidad de *A. brasiliensis* estimada del recuento de colonias en los 3 ensayos por triplicado, provenientes de la dilución  $10^{-4}$  sembrada en Agar Sabouraud- Dextrosa 4%. Resultado del recuento multiplicado por el factor de la dilución ( $1 \times 10^4$ ) y su respectivo promedio.**

Fechas de Ensayo	VIABILIDAD DE <i>Aspergillus brasiliensis</i>		
	Triplicado	Recuento	$10^{-4}$ UFC/ml  X Factor de dilución ( $1 \times 10^4$ )
2016/05/07	1	101	$1.0 \times 10^6$
	2	111	$1.1 \times 10^6$
	3	103	$1.0 \times 10^6$
2016/05/12	1	96	$9.6 \times 10^5$
	2	105	$1.0 \times 10^6$
	3	110	$1.1 \times 10^6$
2016/05/12	1	104	$1.0 \times 10^6$
	2	102	$1.0 \times 10^6$
	3	108	$1.0 \times 10^6$
<b>Promedio de los 3 ensayos</b>	<b>Total 9</b>	104	$1.0 \times 10^6$

(Triana, 2016)

La viabilidad es sin duda de importancia absoluta a la hora de evaluar las cepas con las que se trabajen, y tener la seguridad de que tanto se ha recuperado el cultivo a través de los distintos países que se hagan de él, de hecho este dato es el que nos permite estandarizar el Inóculo fúngico y así poder valorar y cuantificar el Inóculo. Ahora bien, se ha dicho que la estandarización del Inóculo será de utilidad al laboratorio para validaciones de análisis de mohos, entre otras, las distintas actividades del sistema de calidad donde se requiera del cultivo de **A. brasiliensis** cuantificado para pruebas específicas, entonces cabe aclarar que una vez se utilice este Inóculo para validación de análisis de hongos filamentosos, se espera que las distintas matrices de estudio previamente esterilizadas sean inoculadas con esta cepa de la cual ya se conoce su concentración, recuperado el microorganismo de una manera similar a como se observó en recuento en placa para esta experiencia, claro, en caso de usar las mismas condiciones de crecimiento (medios de cultivos, tiempos y temperaturas de incubación, pH, etc.) y así poder verificar la fiabilidad de los resultados al emplear el método de análisis que se esté validando, desde todos los distintos puntos de observación, reproducibilidad de los datos, variabilidad de los mismos, precisión, exactitud, repetitibilidad entre otros, con objeto de ofrecer resultados a los clientes de calidad.

## 6.5 Pureza

### 6.5.1 Caracterización microscópica

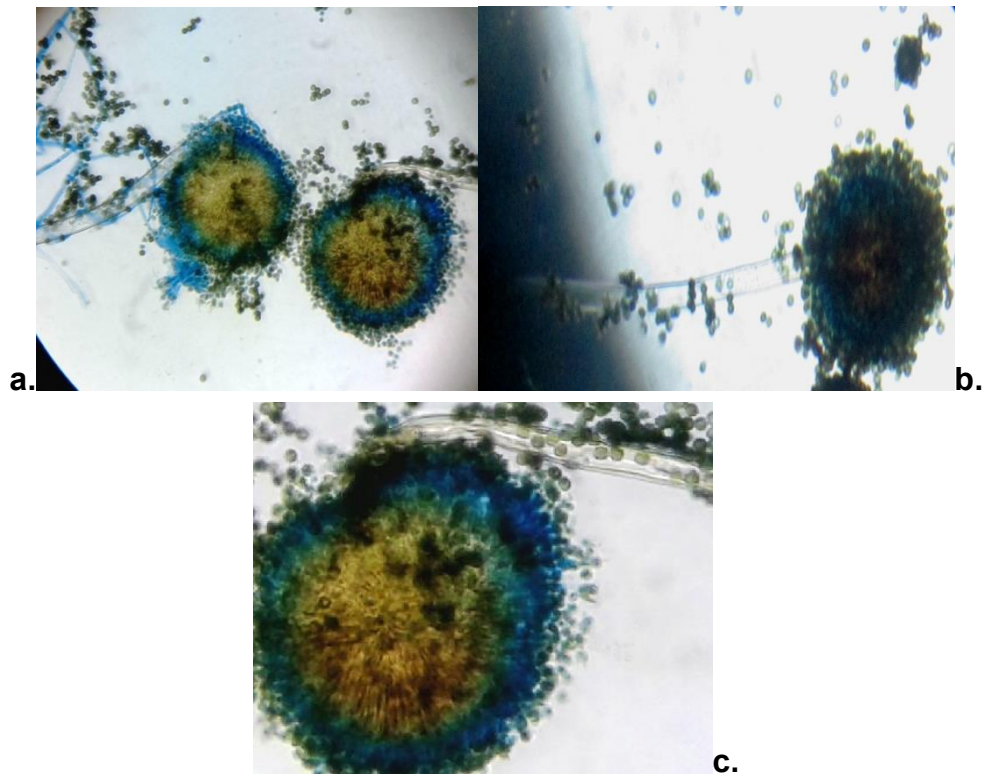
**A. brasiliensis** es miembro del grupo de los *Aspergillus* sección *Nigri*. Este es uno de los taxones más difíciles de clasificar e identificar dentro del grupo de los *Aspergillus* ya que no solo es posible utilizar una distinción morfológica para las especies pertenecientes a él, debido a sus similitudes macroscópicas y microscópicas.<sup>55</sup>

En esta experiencia se analizó por caracterización microscópica, si los aspectos morfológicos observados de la cepa, correspondían en primera medida a los de un *Aspergillus* de la sección *Nigri* y a la posible determinación de especie **A. brasiliensis**, esto con el fin de evaluar que tan pura se encontraba la cepa al momento de ser adquirida por el laboratorio, y si ésta no había sufrido cambios durante los distintos ensayos realizados.



En la Figura 6-4. inciso a, b y c. se observan conidióforos hialinos de pared lisa terminados por vesículas de aspecto globoso y color marrón, las cuales llevan métulas con fiáldes (biseriada) que producen cadenas de conidios secos y esféricos de color café oscuro a negro. Se podría decir que esta caracterización es típica de la morfología microscópica de *A. brasiliensis* si hacemos una contrastación con la descripción realizada del Cultivo de *A. brasiliensis* (sp. nov. CBS 101740, aislada del suelo de Brasil, Australia, EE.UU., Holanda, y de bayas de uva de Portugal) llevada a cabo por Varga y colaboradores (2007). En un estudio donde estos investigadores proponen un enfoque taxonómico polifásico (uso de metodologías de identificación, morfológicas, moleculares y análisis de extrólitos) para identificar ésta nueva especie distinta de los demás *Aspergillus* Sección *Nigri*.<sup>56</sup>

**Figura 6-4. Morfología microscópica a partir de medio de cultivo Agar Sabouraud - Dextrosa 4%, de *A. brasiliensis*, por tinción con Azul de lactofenol visto en 140x. a. b. y c. observación microscópica en cada uno de los tres ensayos.**



(Triana, 2016)

Atendiendo al método de identificación basado en análisis morfológico, realizado por estos científicos, que en sí es lo que compete a la experiencia llevada a cabo en el (LMB), ya que no se utilizó métodos moleculares ni de otro tipo para la identificación de la especie, de la cepa estudiada, es necesario realizar la siguiente comparación: estos autores proponen el uso de un medio de cultivo selectivo como (MEA) para realizar los montajes a partir del crecimiento obtenido del microorganismo en este medio, haciendo uso de microscopía electrónica de barrido (SEM). Donde se vio características similares a las descritas en la (Figura 6-4). Observando cabezas conidiales globosas que en un principio irradian y posteriormente desarrollan diversas columnas conidiales, paredes del conidióforo gruesas, lisas y de color marrón claro, Vesículas de 30-45 micras de ancho, casi globosas biseriadas con Métulas envolviendo usualmente toda la superficie de la vesícula, midiendo 22-30 x 30-6 micras, fiálides en forma de matraces, 7-9 x 3-4 micras y Conidias subglobosa de 3,5-4,8 micras de diámetro, equinulada, y ausencia de esclerocios.<sup>56</sup> Teniendo en cuenta que al utilizar un microscopio electrónico les fue posible detallar cada estructura y sus mediciones, en contraste con lo ocurrido en este estudio ya que el montaje se realizó por microscopía óptica, siendo de una mayor resolución SEM.

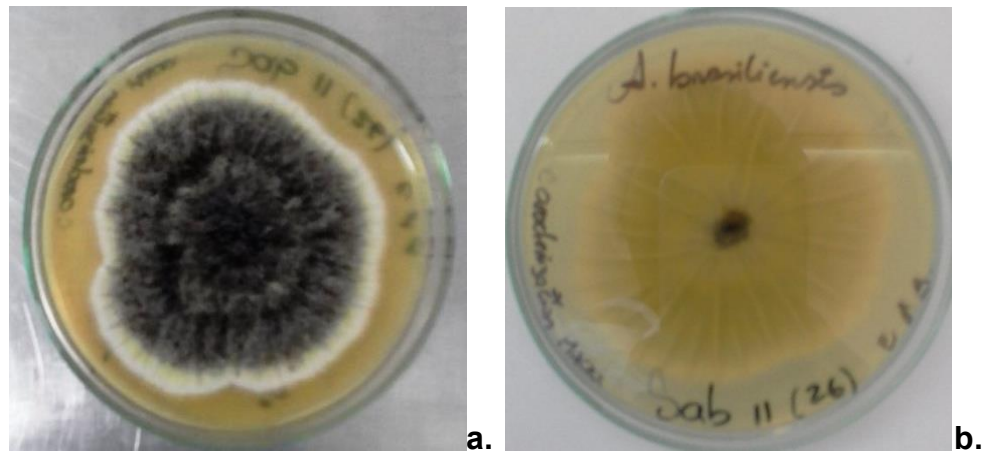
Existen algunas características citadas en el estudio de Varga y coadjutores, donde los aislamientos de la nueva especie que se estudiaba, (***A. brasiliensis***), mostraba, una superficie de conidio equinulada, en oposición con todos los demás miembros del complejo de ***A. niger***, Los conidios de ***A. brasiliensis*** eran más similares a los de ***A. aculeatus*** y ***A. carbonarius***, pero se diferenciaba por ser biseriado y mucho más pequeño en base a ambas especies respectivamente. También se encontró una gran afinidad con ***A. niger*** y ***A. tubingensis***, relacionada con la producción de ácido cítrico, y un buen crecimiento y esporulación a 35°C, y en agar (CYA). En cuanto a los extrolitos producidos algunos eran similares a los que producen otras especies, mas sin embargo también ***A. brasiliensis*** producía otros totalmente únicos, haciendo de éste aislamiento fúngico una especie diferente.<sup>56</sup> Mediante análisis de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), esta especie se distingue de otros *Aspergillus Nigri* en las secuencias de algunos genes específicos como el de la b-tubulina y del gen calmodulina.<sup>56</sup> Esta información es necesaria traerla a colación para aclarar que no es posible basarse solo en claves taxonómica morfológica para la identificación de ***A. brasiliensis***, ya que en primera instancia se podría confundir esta especie con otras, por sus similitudes fenotípicas, y también se estaría dejando de lado otros aspectos importantes que pueden ser útiles a la hora de asegurarnos y confirmar que sea ***A. brasiliensis***. Por ello se

puede decir que el microorganismo fúngico en estudio cumple con las características morfológicas de un *Aspergillus* de la sección *Nigri*, pero para confirmar la especie se hace necesario usar un criterio adicional que debería ser genético, por ejemplo un AFLP, con objeto de tener la certeza que la cepa es *A. brasiliensis*. Sin embargo se cuenta con el certificado de autenticidad de la cepa y se ha determinado que la cepa usada es pura ósea que no posee contaminaciones, y puede ser usada por el laboratorio para sus distintas actividades como herramienta de trabajo.

### 6.5.2 Caracterización macroscópica

En la Figura 6-5. Se observa la morfología macroscópica del *A. brasiliensis*, apreciando una colonia blanca de borde irregular con producción de micelio aéreo algodonoso de color negro-grisáceo, de aspecto denso y capa suave. Su reverso se observa pálido amarillento.

Figura 6-5. Cultivo de *A. brasiliensis* sembrado por punción en Agar Sabouraud–Dextrosa 4 %. a. b. Observación macroscópica del crecimiento del hongo y su reverso (respectivamente).



(Triana, 2016)

Las descripciones realizadas por Varga, Frisvad y Samson se asemejan también a lo descrito en la Figura 6-5. Puesto que ellos observaban en medio CYA y otros medios de cultivo selectivos para el crecimiento y esporulación del hongo, un

crecimiento de la Colonia blanco que luego pasa a color marrón oscuro y a negro, y un reverso de color crema a marrón claro. <sup>56</sup>

## 6.6 Evaluación estadística

Dentro del análisis de varianza de los datos obtenidos para cada uno de los métodos aplicados, (Tabla 6-5) (Figura 6-6).

**Tabla 6-5. Análisis estadístico de logaritmo <sup>(10)</sup> del recuento de las colonias (UFC/ml) de *A brasiliensis* en Agar Sabouraud-Dextrosa 4% a partir de las dilución de la que se obtuvo la viabilidad del microorganismo ( $10^{-4}$ ). Análisis estadístico del logaritmo <sup>(10)</sup> de los conteos en cámara de Neubauer para el ajuste del Inóculo. Promedio de los datos, Coeficiente de variación, Desviación Estándar, intervalos de confianza (límite superior, límite inferior).**

Parámetros estadísticos de estandarización del Inóculo <i>Aspergillus brasiliensis</i>		
Método	Recuento en Placa UFC/ml	Cámara de Neubauer Esporas/ml
Parámetro estadístico	$10^{-4}$	$10^{-1}$
Promedio (UFC/mL)	6.02	6.03
DesvEst (UFC/mL)	0.01	0.02
CV%	0.32	0.35
Nivel de confianza (95,0%)	0.01	0.01

Parámetros estadísticos de estandarización del Inóculo  
***Aspergillus brasiliensis***

<b>Límite inferior 95%</b>	5.98	6.00
<b>Límite superior 95%</b>	6.04	6.05

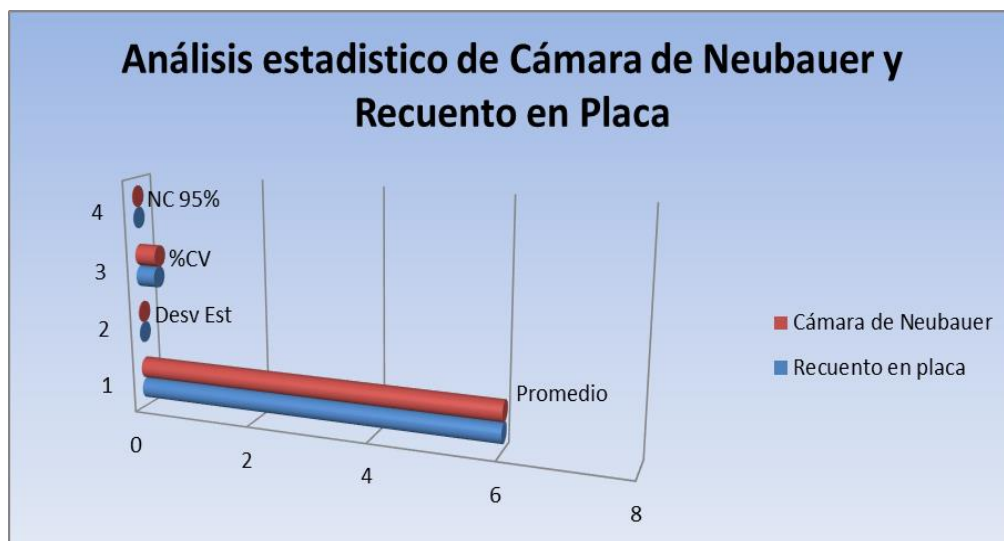
(Triana, 2016)

En el Conteo en cámara y Recuento en placa, es posible precisar que la variabilidad de los contajes de UFC fue más baja con respecto a conteo en cámara de Neubauer, no siendo significativas sus diferencias, esto puede ser considerado a partir de sus desviaciones estándar, siendo la desviación por conteo en cámara de 0.02 con respecto a recuento en placa 0.01, estando un poco más dispersos los datos para el primer método con respecto al segundo. Estos resultados se corroboraron al analizar los CV de las lecturas obtenidas para cada variable siendo 0.32% para Recuento en placa y 0.35% para Cámara de Neubauer, lo cual indica que los datos varían 0.32% y 0.35% con respecto a sus valores promedio para cada caso 6.02 y 6.03 respectivamente.

En cuanto al error aleatorio que pueda presentarse entre el límite superior y el límite inferior de los resultados para ambos métodos <sup>30</sup>, se observó que no hay una diferencia estadísticamente significativa (de 0,1), entre estos intervalos con respecto al valor probabilístico de la media, con un nivel del 95,0% de confianza <sup>30</sup>

En la Figura 6-6 se observan los parámetros estadísticos analizados observando que el promedio de los resultados en cámara con respecto a Recuento en Placa, no difieren mucho, siendo un poco mayor el promedio de conteo en Cámara. Se observa que los coeficientes de variación son muy bajos conjuntamente con la desviación estándar, con un error aleatorio muy mínimo a un nivel de confianza del 95%. <sup>50</sup> Lo cual quiere decir que los Conteos de Colonias estuvieron en un promedio relacionado con el ajuste inicial en la cámara de Neubauer, similar a lo observado por Petrikou y colaboradores (2001).

**Figura 6-6. Análisis estadístico del logaritmo de los resultados tanto para Cámara de Neubauer como Recuento en Placa. Parámetros analizados, Promedio, (%CV) coeficiente de variación, (Desv Est) desviación estándar, bajo un nivel de confianza del 95%.**



*(Triana, 2016)*

### **6.7 Correlación entre el Recuento de esporas por cámara de Neubauer y Recuento en placa.**

Se parte del hecho de que cada conidio contado debería dar origen a una colonia en cultivo <sup>32</sup> esto supone que el número de esporas presentes en la suspensión a estandarizar debe originar un número de colonias correlacionado con el previo conteo en cámara, siempre y cuando todas las esporas fuesen viables, sin embargo este hecho suele no ser un patrón o estándar para todos los casos ya que en experiencias como la de Lage y contribuyentes (2012) se observó que “el conteo de UFC/mL en cultivo, como procedimiento de verificación de una preparación adecuada del Inóculo, resultó ser un inconveniente para la normalización de la técnica”, obteniendo una gran variabilidad en los resultados emanados por Recuento en placa, suceso contrario para esta experiencia ya que lo acordado entre recuento en cámara y en placa presentó un porcentaje del 98% en cuanto a la recuperación de las esporas con una viabilidad de  $1.0 \times 10^6$  (como se puede ver en la Tabla 6-6), aclarando que en la práctica de estos investigadores se trabajó además con método espectrofotométrico y con hongos del género

Fusarium, los cuales son muy distintos tanto en aspecto morfológico como en características fisiológicas y requerimientos de cultivo a los hongos filamentosos del género *Aspergillus*.<sup>32</sup>

Tabla 6-6. % de recuperación de esporas viables, partiendo de un total de esporas viables y no viables, contadas en Cámara de Neubauer para ajuste del Inóculo de *A. brasiliensis*, por conteo directo al microscopio. Verificado por recuento en placa, obteniendo. % de recuperación igual al logaritmo del promedio de la viabilidad (suministrado por la tabla 5) / el logaritmo <sup>(10)</sup> del promedio de esporas contadas en cámara (conteo suministrado por las tablas 2 y 3), multiplicando dicho resultado por 100.

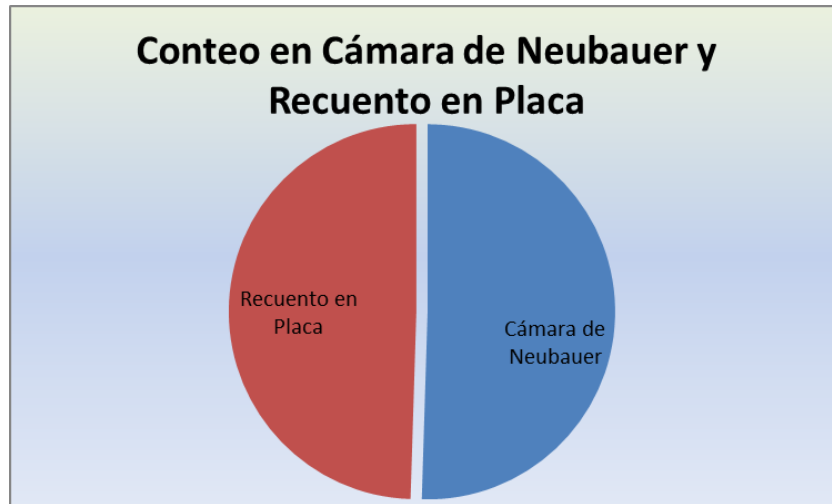
<b>PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ESPORAS DEL INÓCULO DE <i>A. brasiliensis</i></b>			
	<b>Inóculo Ajustado</b>	<b>Viabilidad</b>	<b>% de Recuperación</b>
	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	
	<b>Esporas/ml</b>	<b>UFC/ml</b>	<b>(Esporas viables / Inóculo ajustado) x100</b>
<b>Promedios</b>	6,03	6,02	99.83%

(Triana, 2016)

Otra experiencia donde los resultados entre Recuento en cámara y Placa tuvieron una concordancia similar a la de esta investigación es la de Petrikou y colaboradores (2001) siendo el 97,2% lo acordado entre Recuento en Placa y Hematocitómetro para la preparación del Inóculo de Hongos patógenos de humanos.

En la Figura 6-7. Se puede apreciar que Cámara de Neubauer no difiere en gran manera con recuento en placa, observando una recuperación del 99.83% (ver Tabla 6-6) de las esporas con una alta viabilidad como se dijo anteriormente de  $1.0 \times 10^6$ .

**Figura 6-7. Gráfico de Torta .Correlación entre los promedios de los Conteo en cámara de Neubauer y Recuento en placa.**



*(Triana, 2016)*

Esto puede atribuírsele a que no trascurió mucho tiempo entre la preparación del Inóculo y la siembra en placa y que se trabajó con un cultivo joven de segundo pase, atendiendo a todas las recomendaciones del proveedor de la cepa y su ATCC utilizando uno de los medios adecuados para su crecimiento y esporulación, a una temperatura adecuada, manejando todas las medidas de control como las ya mencionadas también para asegurar un ambiente libre de contaminantes y el implemento de material debidamente estéril.



## 7 CONCLUSIONES

El proceso de Limpieza y desinfección realizado a la cabina de flujo laminar fue eficaz. En todos los ensayos realizados se obtuvo recuentos de hongos filamentosos y levaduras de 0 UFC.

El medio de cultivo seleccionado para la adecuada esporulación de *A. brasiliensis* es PDA.

Por Recuento en Placa se logró soportar lo acordado en cámara de Neubauer, observando una tendencia lineal y exponencial del cultivo.

Se logró la estandarización del Inóculo de *A. brasiliensis* en una concentración de  $1.0 \times 10^6$  UFC/ml para su uso en pruebas de control de calidad y validación de análisis de mohos en el Laboratorio Microbiológico de Barranquilla.

Se evaluó la pureza de *A. brasiliensis* tanto por observación microscópica y macroscópica estableciendo que no hubo una variación de las características del Inóculo estandarizado estando la cepa libre de contaminantes.

Se evaluó la viabilidad de *A. brasiliensis* siendo de  $1.0 \times 10^6$  UFC/ml.

Se determinó que no hubo una variabilidad significativa entre los datos obtenidos por recuento en placa con respecto a Cámara de Neubauer asegurando una baja fluctuación para cada uno de los datos obtenidos entre sí, como también poca variabilidad entre los dos métodos, siendo menos variables los resultados obtenidos por Recuento en placa con un % de CV de 0.32 %.

No hay diferencias estadísticamente significativas en los resultados, siendo reproducibles y adecuados para la estandarización del Inóculo de *A. brasiliensis* con un Nivel de Confianza del 95%

El porcentaje de concordancia entre los recuentos Hematocitómetro y los recuentos de colonias fue del 99.83%

## 8 SUGERENCIAS

Se recomienda para una experiencia posterior aumentar el número de ensayos con propósito de incrementar la fiabilidad de los resultados y hacer de la experiencia un procedimiento más significativo estadísticamente <sup>20</sup>

Se sugiere como un propósito a cumplir en el Laboratorio Microbiológico de Barranquilla, trabajar no solo en la estandarización de las cepas fúngicas como se llevó a cabo en esta experiencia, si no poder validar el método de estandarización utilizado, lo cual ampliaría el alcance de los objetivos propuestos, haciendo hincapié en que para tal fin, deberán utilizarse muchas más cepas fúngicas y así corroborar que el método sea eficaz para la estandarización del Inóculo de cada una de ellas, validando la confiabilidad del método.

De otras experiencias como la de Petrikkou y colaboradores (2001) se sabe que el método espectrofotométrico presenta algunos inconvenientes como se ha dicho anteriormente, por el tamaño y el color de las esporas que influyen en la medida de la absorbancia (DO). En esta experiencia no podría afirmarse tal suceso ya que no se utilizó este método para la estandarización del Inóculo de *A. brasiliensis*, se sugiere en una próxima experiencia comparar ambos métodos, Cámara de Neubauer y método espectrofotométrico, ambos soportados por Recuento en placa y así poder corroborar lo que establece la literatura.

A la hora de evaluar la cepa, para la identificación de la especie, se sugiere la utilización de un enfoque Taxonómico polifásico, donde se incluya métodos adicionales, de carácter genético.

Este estudio está sujeto a cambios posteriores, ya que a la hora de evaluar las condiciones de los medios de cultivo, que para este caso tenía como propósito compararlos para escoger el que más se ajustara a las necesidades de la experiencia, es importante que dicha evaluación se haga bajo un concepto unificado para todas y cada una de las características a evaluar, lo cual no ocurrió con el pH. Por otro lado de la misma forma es necesario unificar todas las condiciones de estandarización de *A. brasiliensis*, desde el tiempo y la temperatura de incubación hasta el método a utilizar para conservarlo, entre otros. Por ello se podría decir que esta metodología es una estandarización parcial susceptible a mejoramientos por parte de las analistas encargadas en el Laboratorio Microbiológico de Barranquilla.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. ABARCA, Lourdes. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis Nosocomial. Informe de Grupo Científico de la Universidad Autónoma de Barcelona. España; 2000. S79-S84.
2. Acta bioquímica clínica latinoamericana. En Redalyc. Vol.; 43 No.1 (Ene.-Mar. 2009).
3. AGAMEZ, Elkin; ZAPATA, Raúl; OVIEDO, Luis y BARRERA, José. Evaluation of Substrates and Fermentation solid Process for Spores Production of *Trichoderma* sp. En Revista Colombiana de Biotecnología. Vol.; 10. No.2 (Juli-Dic.2008); Pág. 1.
4. AGUIRRE OTÁLORA, Natalia. Determinación del efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi*. Bogotá, 2006. Trabajo de grado (Microbióloga industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
5. ARIAS, Edna y PIÑEROS, Paola. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde. Trabajo de Grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología, 2008. p. 27.
6. *Aspergillus brasiliensis*. {En línea}. {Citado en 2016}. Disponible en: (<https://translate.google.com.co/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.atcc.org/products/all/16404.aspx&prev=search>).
7. Bioestadística. {En línea}. {Citado el 07 de mayo de 2016}. Disponible en: (<http://www.fao.org/3/a-w5449s/w5449s03.pdf>).
8. BONILLA, Tania; SANDOVAL, Ileana; LÓPEZ, María y PORRAS, Ángela. Determinación del Medio de Cultivo para el Crecimiento y Esporulación de *Sarocladium Oryzae*. En Revista Redalyc. Vol.; 6. No. 1 (marzo.2002); pág. 15-18.

9. BOTELLA, P.; ALACREU, M. y MARTÍNEZ, MA. Apuntes de Estadística en Ciencias de la Salud En Estadística de la Salud. Generalitat Valenciana. p.17, 19.
10. CABEZA, Enrique. Fundamento de microbiología predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas. Pamplona, 2013. p. 1.
11. CAMACHO, A.; GILES, M.; ORTEGÓN, A.; SERRANO, B.; Y VELÁZQUEZ, O. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. México: 2ª ed, 2009. (UNAM)
12. CAÑEDO, Verónica; AMES T.; HIDALGO, Milton y LAFOSSE, Cecilia. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima Perú, 2004. 62 p.
13. CÁRDENAS, Virginia. Planilla Registro Control de Pureza y Viabilidad de Cepas. Laboratorio microbiológico Barranquilla, 2014.
14. CÁRDENAS, Virginia. Procedimiento para el control de materiales de referencia. Laboratorio microbiológico Barranquilla 2016.
15. CÁRDENAS, Virginia. Procedimiento para el control de ambientes, Área Microbiología. Laboratorio microbiológico Barranquilla 2016.
16. CASAS, José Luis. Producción de Lovastatina a partir de *Aspergillus terreus* en un reactor de Lecho Fluidizado. Tesis Doctorales (Edición Electrónica), 2005. p.1.
17. CHIRIBOGA, Hernán; GOMÉZ, Graciela y GARCÉS, Karla. Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: beauveria bassiana, hongo Entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú). {En línea}. {20 de enero de 2016}. Disponible en: ([ica.int/sites/default/files/publications/files/2016/B3935e.pdf](http://ica.int/sites/default/files/publications/files/2016/B3935e.pdf)).
18. CRUZ, Lina. Estandarización del proceso de Producción masiva del Hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante Fermentación Bifásica a Escala Piloto. Trabajo de Grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología, 2007. p. 17-92.

19. Cuantificación de levaduras en cámara de recuento Neubauer improved o Thoma. {En línea}. {Citado el 24 de mayo de 2016} Disponible en: ([http://insilico.ehu.es/camara\\_recuento/](http://insilico.ehu.es/camara_recuento/)).
20. Departamento administrativo nacional de estadístico dirección de censos y demografías estimación e interpretación del coeficiente de variación de la encuesta censal censo general. {En línea}. {Citado en junio de 2008}. Disponible en: ([http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est\\_interp\\_cofvariacion.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est_interp_cofvariacion.pdf)).
21. E, Merck. Manual de medios de cultivo Merck. Darmstadt, Alemania. 1994. 144 p.
22. Estadística aplicada a la investigación en salud Medwave. {En línea} Rev. mayo de 2016. Disponible en: (<http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Series/MBE04/>).
23. FELIX, José. PhD. Laboratorio nº 2 Medida del Crecimiento Microbiano Cámaras de Recuento Microbiológico. p. 1-4.
24. FERNÁNDEZ, Federico. Producción de Xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo. Informe de Grupo Científico de la Universidad Autónoma de Querétaro. México; 2012.
25. GARAY, Esperanza; AZNAR, Rosa; LALUCAT, Jorge, y RIBAS, Ferrán. Informe técnico sobre Cepas de trabajo en el Laboratorio de Análisis Microbiológico. Primera edición: 2006.
26. GÓMEZ, Patricia y MENDOZA, Jorge. Técnica no. 5 Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador. Ecuador, 2004. p. 2-8.
27. GONZÁLEZ, Amaia. Diagnóstico y Control de Especies de *Aspergillus* Productoras de Ocratoxina. TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR. MADRID: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. Departamento de Genética, 2010. p. 16.

28. GUÍA TÉCNICA GTC COLOMBIANA 84. Guía para la orientación acerca de la Validación de métodos de Análisis Microbiológicos. ISO/TR13843:2000, Bogotá D.C: Microbiología de agua, análisis microbiológico, calidad del agua, 2003.
29. HERNÁNDEZ, Miguel; DEL RIO, Eva y SOGORB, Miguel. Ensayo de Ecotoxicidad de inhibición del Crecimiento de Algas. Recuento celular en Cámara de Neubauer. 2014. (Formato Mp3). 8 minutos, 2 segundos.
30. Intervalos de Confianza para la Media y para las Proporciones. Algunas secciones han sido tomadas de: Apuntes de Estadística Inferencial Instituto Tecnológico de Chihuahua. [Diapositivas], 18 diapositivas.
31. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988.
32. LAGE, Liset; PANIZO, María; FERRARA, Giuseppe y REVIKINA, Vera. Validación del Inóculo por Densitometría para las Pruebas de Susceptibilidad a los Antifúngicos en especies del Género *Fusarium* En Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol.; 1 (2013); Pág 47-52.
33. LEMUS, Yuly; M., Ginna; A., Raúl; DURÁN, Antonio; ZULUAGA, Claudia y RODRÍGUEZ, Gloria. Determinación de la factibilidad del hongo *metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Attacephalotes*). En Revista científica Guillermo de Ockham. Vol.; 6. No.1 (Ene-Jun. 2008); Pág 95.
34. MÉNDEZ, Luis. Universidad nacional autónoma de México UNAM Departamento Microbiología y Parasitología recursos en Micología. Aspergillosis. Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades C.M.N. Siglo XXI. {En línea}. {Citado el 07 de Junio de 2016}. Disponible en: (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>).

35. Microbiologics KWIK-STIK™ plus PI. 194. Rev.2007. p. 1-6
36. Microkit. Medios de Cultivo. {En línea}. {Citado el 22 de abril de 2015}. Disponible en: (<http://www.medioscultivo.com/chloramphenicol-glucose-agar-y-g-c/>).
37. Mohamed, R., El-Yazid, H. & Hassan, A. (2014). A guide for classification and identification of aspergilli, diseases caused by them, diagnosis and treatment. [Archivo PDF]. Recuperado de [https://scholar.cu.edu.eg/?q=hanem/files/monograph\\_on\\_aspergillus\\_and\\_a\\_spergillosis\\_in\\_man\\_animals\\_and\\_birds.pdf](https://scholar.cu.edu.eg/?q=hanem/files/monograph_on_aspergillus_and_a_spergillosis_in_man_animals_and_birds.pdf)
38. NCBI. Taxonomy Browser. {En línea}. {Citado en 2016}. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&iid=1131492&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
39. NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA. Microbiología de Alimentos y Productos para Alimentación Animal. NTC 4092 2009-12-16. ISO 7218:2007, Bogotá D.C: Microbiología de alimentos, análisis microbiológicos, productos lácteos, buenas prácticas, 2009. p.12-24, 64
40. OAA ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN. Guía para la Validación de métodos Microbiológicos. Argentina, 2013. Código. GUI-LE-05 Version. p. 4, 10-15.
41. ORTEGA, Meylín; RODRÍGUEZ, Claudio y RAISA, C. Validation of alternative methods for the microbiological analysis of food products and water. {En línea}. {Citado el 20 de Noviembre de 2012}. Disponible en: ([http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol51\\_1\\_13/hie11113.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol51_1_13/hie11113.htm)).
42. ORTIZ, Diana. Validación e implementación de una Metodología para el Análisis Microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una Industria Farmacéutica. Trabajo de Grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología, 2008. p.5, 21.
43. PADILLA, José. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un Laboratorio de Referencia. Trabajo de Grado Microbiología

Industrial. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología, 2007. p. 2-4.

44. PETRIKKOU, E.; RODRÍGUEZ, Tudela; CUENCA, Estrella; GÓMEZ, A. y MELLADO, E. inoculum standardization of antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi Pathogenic to Humans. 2001. 1345-7.
45. PETRIKKOU, E.; RODRÍGUEZ, Tudela; CUENCA, Estrella; GÓMEZ, A. y MELLADO, E. Standardization of inoculum preparation for anti fungal susceptibility testing of emerging filamentous fungi. En: 11 Congreso Europeo de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas.
46. Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal. En Redalyc Ciencia et Technica. No 33 (May.2007).Pág. 138.
47. Rev.21 Febrero 2015. Disponible en (<http://www.lmb.com.co/>).
48. RUIZ, H. y RODRÍGUEZ, AR. Allergic fungi: importance of the standardization of fungal extracts and their application on clinical practice. 2006. 144-9.
49. SALMERÓN, Iván, y MARTÍNEZ, Cristina. Cuenta de Cóliformes, Hongos y Levaduras en arroz (bolsa, a granel).
50. Samson, R., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. & Varga, J.(2007). Studies in mycology: Diagnostic tools to identify black aspergilla En: PMC-NCBI {En línea}. No. 59 (2007). Disponible en <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2275192/#ref29>> [Citado el 20 de Noviembre de 2016].
51. SECRETARIA DE GOBERNACIÓN SEGOBDIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. Para la identidad y especificidad de la Cámara tipo Neubauer para el Conteo de Células (Hematímetro). NORMA Técnica número 235, 1998.
52. SHIRAKOV, V. Análisis Experimentales (Diseño de Experimentos). Manual de Hilandería. Moscú, 1985. p. 392-394.
53. TANGARIFE, Verónica. Programa de integración de Tecnología a la Docencia Vicerrectoría de Docencia universidad de Antioquia. {En línea}. {Citado el 30



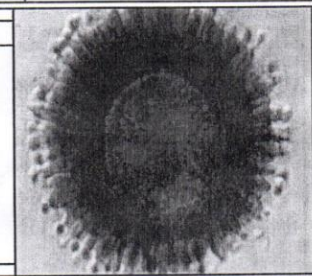


de abril de 2016, 11:53}. Disponible en: (<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100892>).

54. Thermo scientific. Oxoid Microbiology Products. Medios de Cultivo Deshidratados. {En línea}. {Citado en 2016}. Disponible en: ([https://translate.google.com.co/translate?hl=es-419&sl=en&u=http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp%3Fpr%3DCM0139%26sec%3D%26org%3D96%26C%3Duk%26lang%3DEN&prev=search](https://translate.google.com.co/translate?hl=es-419&sl=en&u=http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp%3Fpr%3DCM0139%26sec%3D%26org%3D96%26C%3Duk%26lang%3DEN&prev=search)).
55. Varga, J., Frisvad, J., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. & Samson, R. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. [Archivo PDF]. Recuperado de <http://www.cbs.knaw.nl/publications/Sim69.pdf>.
56. Varga, J., Kocsube, S., Tóth, B., Frisvad, J., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. [Archivo PDF]. Recuperado de <http://www.cbs.knaw.nl/images/ResearchGroups/Publications/2007Varga0001.pdf>.

## **ANEXOS**

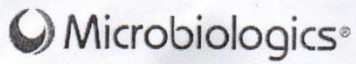
**ANEXO 1. CERTIFICADO DE ORIGEN DE LA CEPA *A. brasiliensis* ATCC 16404.**

		<b>Molecular Epidemiology, Inc.</b>					
		<b>Sample Analysis Report</b>			Laboratories & Consulting Group		
		F09/MB450/09					
<b>Customer ID Number</b>	4081-3201	<b>Sample Received</b>	01/06/2016	<b>MEI Report #</b>	R16011824206-01	<b>Date Reported</b>	01/20/2016
<b>Customer Sample #</b>	392-462	<b>Sample Type</b>	Agar plate	<b>Job ID</b>	97839-4081-3201		
<b>Sample Source</b>	N/A	<b>Customer Comments</b>	Aspergillus brasiliensis	<b>Requested Service(s)</b>	Phenotypic and Genetic Identification		
<b>MEI Sample #</b>	89846-1			<b>Test Method(s)</b>	MB450, MB457, MB473		
<b>Test</b>	<b>Test Results</b>						
<b>Basic ID</b>	Fungus						
<b>Colony</b>	Black						
<b>Reverse</b>	White						
<b>Spore</b>	Conidia: subglobose, rough, brown, 4-5 µm						
<b>Genetic ID</b>	Comparisons to genetically similar microorganisms			<b>Notes:</b> Phenotypic data support <i>Aspergillus brasiliensis</i> .			
<b>Genetic Distance</b>	<b>Genus</b>	<b>Species</b>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>brasiliensis</i>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>carbonarius</i>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>ibericus</i>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>phoenicis</i>					
0.0032	<i>Aspergillus</i>	<i>tubingensis</i>					
0.0116	<i>Aspergillus</i>	<i>aculeatus</i>					
0.0146	<i>Aspergillus</i>	<i>japonicus</i>					
<b>Deviations</b>	None						
<b>Microbial ID Conclusion</b>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>						
<b>Microbiology Review</b>	_____ Anthony Scotti		Date:		01/20/2016		
<b>Genetics Review</b>	_____ Songhai Shen		Date:		01/20/2016		
<b>QC Approval</b>	_____ Connor Tyler		Date:		01/20/2016		
<b>QA Approval</b>	_____ Andrew Lee		Date:		01/20/2016		
<b>Reported By:</b>	Gregory J. Ma, SM(AAM), MSPH		Molecular Epidemiology, Inc.				
	Phone: 206-306-8882		15300 Bothell Way NE,				
	Fax: 206-306-8883		Lake Forest Park, WA 98155				
	e-Mail: gregory@molecularepi.com		www.molecularepi.com				


This laboratory report relates only to the portion of the sample which was tested in this report. Interpretation of these results is the sole responsibility of the Customer.

TRADE SECRET - CONTAINS CONFIDENTIAL COMMERCIAL INFORMATION

This document contains confidential commercial information pursuant to 5 U.S.C sec. 552(b)(4). Copyright 2007 © by MEI



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Aspergillus brasiliensis Catalog Number: 0392 Lot Number: 392-462 Reference Number: ATCC® 16404™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2	<b>Expiration Date:</b> 2017/11/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2016/1/21
<b>Macroscopic Features:</b> Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow.	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> PDA <b>Method:</b> Lactophenol Blue (1)
<b>Microscopic Features:</b> Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle	
<b>ID System:</b> MEI None See attached ID System results document.	
	 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE

**ANEXO 2. PLANILLAS DE CONTROL DE AMBIENTES DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR**

# 421

LABORATORIO MICROBIOLÓGICO BARRANQUILLA  
 PLANILLA DE REGISTRO Y CONTROL  
 VERIFICACIÓN DIARIA DE CABINA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL  
 ÁREA MICROBIOLOGÍA

MARCA: ESCO

SERIE: 204-93985

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: MESOAEROBIOS: 0 UFC / CAJA    MOHOS Y LEVADURAS : 0 UFC / CAJA

FECHA	HORA	RTO. MESOAEROBIO S UFC / CAJA	RTO. DE MOHOS Y LEV. UFC / CAJA	CUMPLE		OBSERVACIONES	FIRMA Y CARGO DEL RESPONSABLE
				SI	NO		
20160429	07:30	0	0	X		—	AR.
20160430	07:15	0	0	X		—	AR.
20160502	07:26	0	0	X		—	AR.
20160502	02:00	0	0	X		—	AR.
20160503	07:47	0	0	X		—	AR.
20160504	08:02	0	0	X		—	AR.
20160504	02:00	0	0	X		—	AR.
20160505	07:34	0	0	X		—	AR.
20160505	08:20	0	0	X		—	AR.
20160506	7:50	0	0	X		—	AR.
20160507	7:57	0	0	X		—	AR.
20160507	7:42	0	0	X		—	AR.
20160507	8:00	0	0	+		—	AR.
20160511	07:40	0	0	+		—	AR.
20160511	11:08	0	0	+		—	AR.
20160522	7:22	0	0	X		—	AR.

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

VERSIÓN:1    VIGENTE DESDE: 2004-04-05

*AR*

#421

LABORATORIO MICROBIOLÓGICO BARRANQUILLA  
PLANILLA DE REGISTRO Y CONTROL  
VERIFICACIÓN DIARIA DE CABINA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL  
ÁREA MICROBIOLOGÍA

MARCA: ESCO

SERIE: 2014-93985

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: MESOAEROBIOS: 0 UFC / CAJA    MOHOS Y LEVADURAS : 0 UFC / CAJA

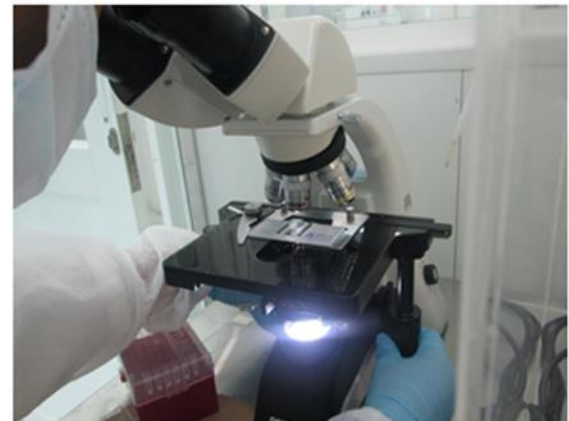
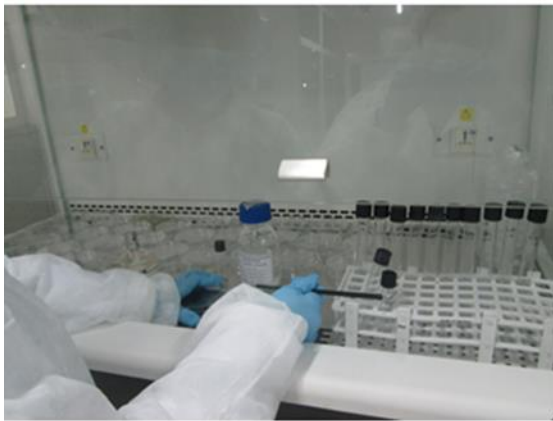
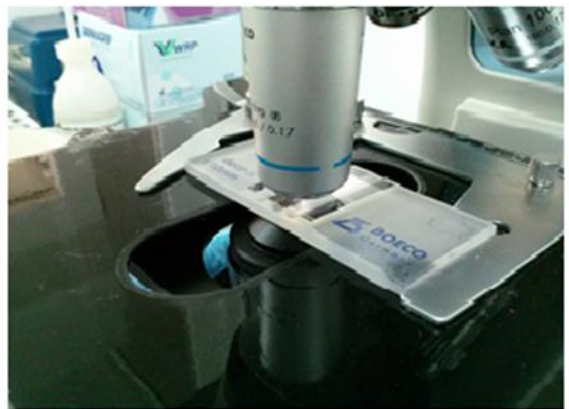
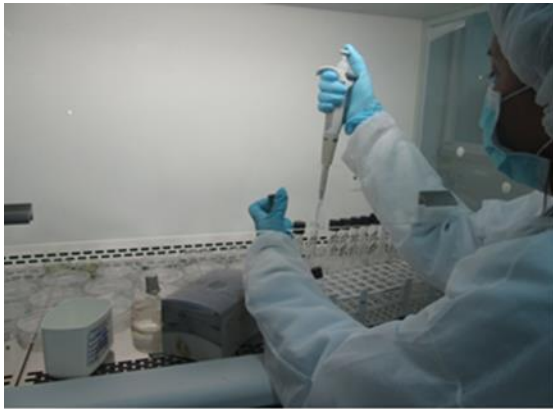
FECHA	HORA	RTO. MESOAERBIOS UFC / CAJA	RTO. DE MOHOS Y LEV. UFC / CAJA	CUMPLE		OBSERVACIONES	FIRMA Y CARGO DEL RESPONSABLE
				SI	NO		
20160413	07:35	0	0	X		—	AR
20160414	07:25	0	0	X		—	AR
20160415	07:30	0	0	X		—	AR
20160416	07:25	0	0	X		—	AR
20160418	08:17	0	0	X		—	AR
20160419	07:40	0	0	X		—	AR
20160420	07:30	0	0	X		—	AR
20160421	07:35	0	0	X		—	AR
20160422	08:18	0	0	X		—	AR
20160423	07:40	0	0	X		—	AR
20160425	08:20	0	0	X		—	AR
20160426	10:30	0	0	X		—	AR
20160426	03:20	0	0	X		—	AR
20160427	07:30	0	0	X		—	AR
20160427	02:30	0	0	X		—	AR
20160428	7:57	0	0	X		—	AR

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

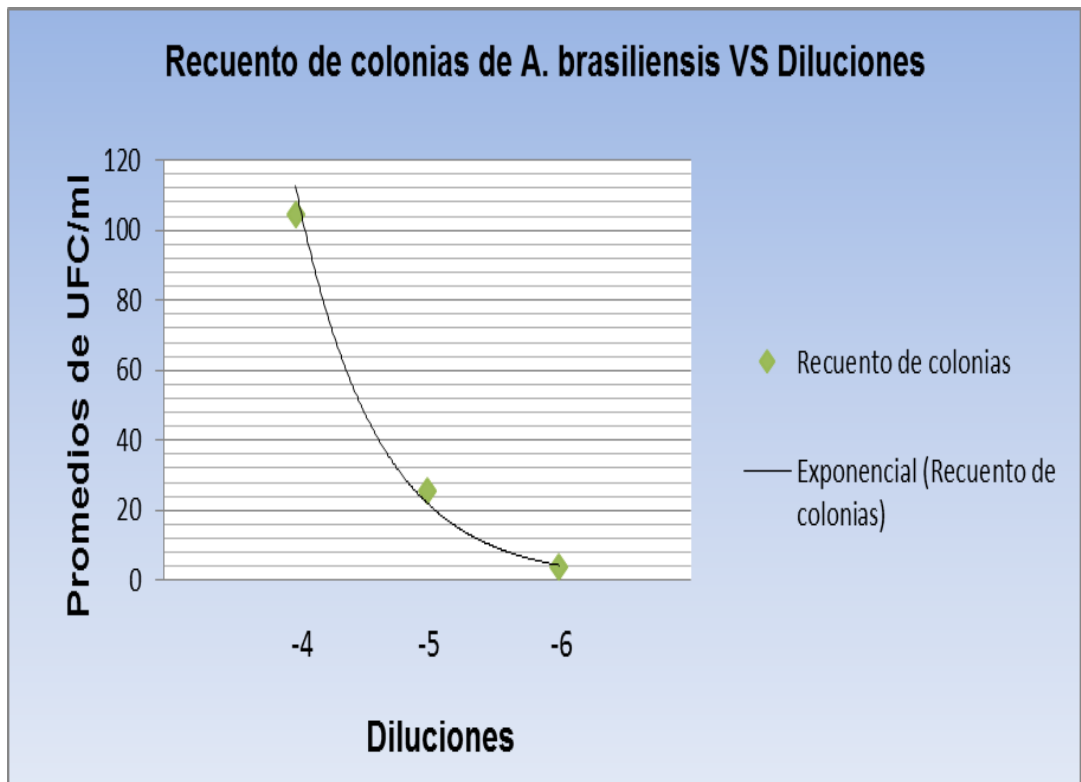
8

VERSIÓN:1      VIGENTE DESDE: 2004-04-05

**ANEXO 3. PROCEDIMIENTO DE ETANDARIZACIÓN (MATERIAL FOTOGRAFICO)**

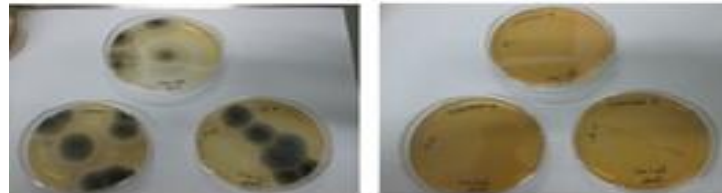
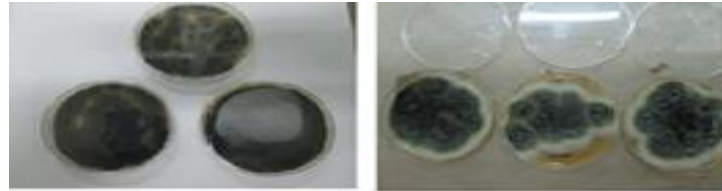


**ANEXO 4. GRÁFICO EXPONENCIAL DEL PROMEDIO DE LOS RECUENTOS DE COLONIAS DE *A. brasiliensis* EN AGAR AL 4% DE DEXTROSA SABOURAUD VS DILUCIONES ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ).**

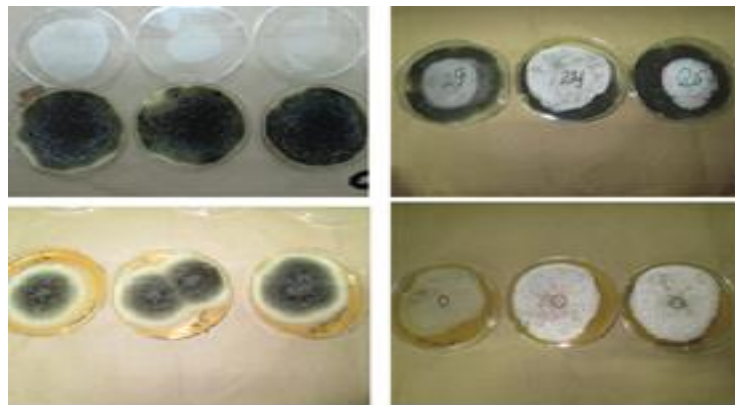




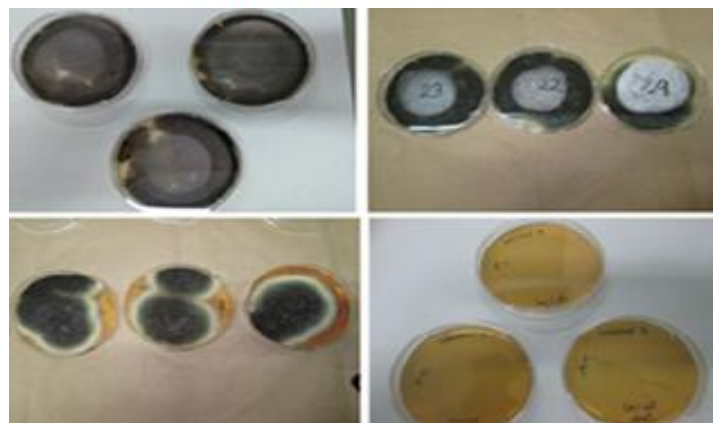
**ANEXO 5. RECuento EN PLACA EN AGAR AL 4% DE DEXTROSA SABOURAUD DE *A. brasiliensis***



Ensayo 2016/05/07



Ensayo 2016/05/12



Ensayo 2016/05/12