

Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos

Maria N. Estrada V.¹
Patricia E. Vélez A.¹

Introducción

El paso inicial para comenzar una colección de microorganismos es la adquisición de las cepas, que depende del interés del centro o instituto y se realiza a través de varios mecanismos: obtención a partir de otras colecciones ya establecidas, aislamiento e identificación a partir de su lugar de origen y pase a partir de cultivos puros.

La colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé comenzó en 1990, con el aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a partir de brocas recolectadas en frutos brocados en el Municipio de Ancuyá, Nariño (Vélez y Benavides 1990). Posteriormente, en 1991, ingresaron aislamientos provenientes de la Estación Experimental Tulio Ospina (Bello, Antioquia), del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), de trabajos de investigación, de solicitudes de aislamientos de otros países y muestras recolectadas en los reconocimientos de campo por el personal técnico de Cenicafé, de los Comités Departamentales de cafeteros y de otras instituciones que envían periódicamente muestras de insectos atacados por hongos para su identificación (Posada y Vélez 1997). Asimismo, ingresaron 46 aislamientos del CABI, los cuales fueron utilizados para desarrollar trabajos de investigación (Jiménez 1992).

Tomando en cuenta el valioso recurso genético representado por estos microorganismos y su poten-

cial de uso en programas de manejo integrado de insectos plagas en cultivos de importancia económica, se ha elaborado el presente estudio con el fin de suministrar información acerca de los procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de microorganismos. Esta colección se constituye en una herramienta útil para la comunidad científica nacional e internacional, con propósitos académicos y de investigación.

Registro para el ingreso de aislamientos

La información que se obtiene de cada aislamiento se registra en un formato en el cual se incluyen la fecha, los datos del hospedante, el estadio biológico atacado, la localidad, las condiciones del ataque, campo o laboratorio, el clima predominante, el cultivo, el recolector, la persona que realizó la identificación y los métodos de preservación en laboratorio (Fig.1).

Con la información recolectada, se establecieron las condiciones de ocurrencia y distribución de los aislamientos, agrupándolos por regiones naturales, condiciones predominantes de las localidades: húmedas o secas, altitud, temperatura promedio del lugar de recolección, y método de preservación del aislamiento en condiciones de laboratorio (Posada y Vélez 1997).

La identificación de los insectos hospedantes se hizo con base en la información suministrada por el

¹ Hongos del Trópico Ltda. Cenicafé, La Granja, Chinchina, Caldas, Colombia. resvel@epm.net.co



Cenicafé

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ
"Todo Un Café"

Bb 9308

RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE INSECTOS CON SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD

FECHA: 20/1993
HOJA N°: 29

INSECTO HOSPEDERO

Hypothenemus Juncos Colocastus Scydinid
leñero café leño leño

LUGAR DE COLECCIÓN

Subestación Jorge Velez Finca Vereda Finca Hulla
Finca Vereda Finca Vereda Finca

CONDICIONES AMBIENTALES PROMEDIO

23.4°C 72% 1470 mm 1100 mm
Temperatura H.R. precipitación Altitud

Café
Cultivo

COLECTADO POR: Dr. Fernando Cárdenas M., en condiciones de campo.

CARACTERÍSTICAS: Oruga localizada con presencia del hongo en el sitio de penetración de la oruga al grano.

DIAGNÓSTICO: Resaca de leñero, Bb 9308

OBSERVACIONES: Oruga ubicada en estado adulto.

IDENTIFICADO POR: Dra. PATRICIA EUGENIA VÉLEZ A.

Teléfono: 30490000 - Fax: 30490001 - 30490002 - 30490003 - LA HOJA Mensajes
LA BROCA DEL CAFÉ LO AMENZA: INFORMESE

Figura 1. Registro de la recepción de muestras de insectos.

recolector sobre la especie vegetal atacada, o por la comparación con especies identificadas en la colección de referencia de insectos de Cenicafé, o empleando claves para la identificación (Posada y Vélez 1997).

Aislamiento e identificación del material biológico

Cuando el microorganismo se aísla a partir de un insecto atacado, en condiciones naturales o en condiciones de cría, se comienza por desinfestar el insecto. Para tal fin, se trata con detergente comercial Teepol Plus® (Shell S.A., Colombia) durante cinco minutos y se lava con agua destilada estéril (ADE) usando mallas de tul estériles que sirven de colador. Posteriormente, se coloca en contacto con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (tomar 1cc de hipoclorito de sodio comercial (5,25%) y ajustar a 100 cc con agua destilada estéril) durante dos minutos y se enjuaga con ADE, utilizando de nuevo la malla de tul. Este material desinfestado se coloca en una toalla de papel para que absorba el agua residual. Es importante conocer la fragilidad del material con el fin de utilizar los tiempos de desinfestación adecuados y evitar el fracaso en el aislamiento del agente causal.

Posteriormente, se siembra el material en el medio nutritivo Sabouraud-dextrosa-agar (SDA, Ref. Oxoid o Merck) con ácido láctico al 44% (1 ml por cada 100 ml de medio). Las cajas de cultivo se incuban a 22-25°C hasta la obtención del crecimiento blanco algodonoso, característico del hongo (Barnett 1998, Domsch *et al.* 1980). Se realiza la observación directa del hongo en un microscopio de luz blanca (Ref. Zeiss, Standard 25) mediante la adición de una gota de azul de lactofenol a una parte del cultivo esporulado (Vélez y Benavides 1990).

Para evitar daños en las estructuras del hongo al tomar una parte de inóculo directamente de la colonia desarrollada en el medio nutritivo, se utiliza la técnica del microcultivo, lo que permite identificar fácilmente la ontogenia de las conidias a partir de las células conidiógenas, su forma y tamaño. Para eso, se toma una parte de la colonia del microorganismo en estudio con un asa recta y se siembra por picadura en cajas de Petri con medio SDA. Una vez que el cultivo haya esporulado, al cabo de tres a cinco días, a 25°C, se corta con un bisturí flameado el bloque de agar en el cual se realizó la picadura y se lleva a una lámina portaobjeto; se agrega una gota de azul de lactofenol, se cubre con una laminilla y se observa al microscopio de luz blanca con el objetivo de 40X.

Para facilitar la observación de las estructuras del hongo al microscopio, también se recomienda el uso de la cinta transparente, un método de identificación rápido y confiable que permite observar el microorganismo directamente de la colonia desarrollada en medio enriquecido o del lugar de procedencia: insecto o material vegetal o leñoso. Para esto, se toma la cinta transparente con la ayuda de los dedos índice, colocando en contacto el reverso de la cinta con el microorganismo o la lesión causada por este en el tejido vegetal o leñoso. Posteriormente, la cinta se coloca sobre una lámina portaobjetos con azul de lactofenol y se observa al microscopio de luz blanca, con el objetivo de 40X.

Cuando se requiere el uso de técnicas que aseguren una mayor pureza genética y homogeneidad del microorganismo en estudio, se utiliza la técnica de obtención de esporas individuales, método que ofrece también una alternativa para purificar los hongos y bacterias (Tuite 1969). Una vez esporulado el cultivo del hongo en estudio, se realizan diluciones y de aquella que contenga menos cantidad de esporas, se toma el inóculo con una asa en argolla y se realiza una siem-

bra en estría, sobre las líneas guía que están previamente demarcadas por el reverso de las cajas de Petri con SDA. Al cabo de 24 horas de incubación a 25°C, se observa la espóra germinada al microscopio de luz blanca y se transfiere a un medio enriquecido (Estrada *et al.* 1997).

Mantenimiento del material biológico

Los subcultivos seriados constituyen un método de mantenimiento y son un procedimiento tradicional, el cual consiste en repicar periódicamente el microorganismo a un medio de cultivo fresco y almacenar a temperaturas ambiente o entre 4 y 8°C. A partir de un cultivo puro, se toma una parte del crecimiento del hongo con un asa recta previamente flameada y se siembra por picadura en tubos de agar inclinado o en cajas con medio de cultivo; la incubación se realiza a 22-25°C.

Métodos para la preservación del material biológico

Las técnicas para el aislamiento y la preservación de microorganismos dependen de las características morfológicas y bioquímicas del agente biológico (Snell 1991, Kirsop y Doyle 1991). Existen otros factores que afectan la recuperación y el crecimiento de los mismos, tales como requerimientos nutricionales del medio de cultivo, pH y actividad del agua, la temperatura bajo la cual se almacenan y las condiciones de luz y aireación. Los métodos de preservación que reducen el metabolismo a una dormancia artificial, mediante procesos de congelación o deshidratación, parecen ser los más exitosos (Kirsop y Doyle 1991).

Para la preservación de los aislamientos identificados se utilizan metodologías recomendadas por el Instituto Micológico en Inglaterra (Smith y Onions 1994), en las cuales se asegura una baja actividad metabólica mediante un proceso de remoción gradual del contenido de agua celular, con el menor riesgo de variación en las características fisiológicas y genéticas de cada microorganismo.

La congelación en glicerol al 10% a -25°C, o criopreservación, es una técnica de preservación exitosa, porque el metabolismo está virtualmente suspendido, lo que garantiza estabilidad genética (Joshi *et al.* 1991). Para esto, se obtiene una suspensión de esporas del hongo en agua destilada más glicerol al 10% y, luego de dispensar 2 ml en viales de polipropileno, se somete a un proceso de congelación gradual. Pueden utilizarse temperaturas de congelación bajo 0°C, pero se recomienda el almacenamiento del material biológico

de -15 a -25°C para asegurar una mayor viabilidad e integridad de este a través del tiempo (Fig. 2). Con el propósito de proveer suficiente material, y asegurar un inóculo homogéneo para pruebas que se deben realizar con cierta periodicidad, se preparan suspensiones celulares de concentración conocida en glicerol al 10%, las cuales se almacenan hasta el momento de la realización de las pruebas (Valdés y Vélez 1998).

El proceso de preservación en nitrógeno líquido corresponde al mismo proceso mencionado para la preservación en glicerol al 10% (Fig. 2), con una temperatura final de almacenamiento del material biológico a -196°C, mediante el uso del nitrógeno en tanques diseñados para almacenar los viales de propileno con las suspensiones celulares.

La congelación del material biológico se debe realizar en forma gradual, y la descongelación rápidamente, mediante el calentamiento de la suspensión en baño maría a 37°C durante 15 minutos, lo que generalmente permite altas viabilidades (Heckly 1978) y evita la formación de cristales de hielo que rompen la pared celular, causando lisis o ruptura celular (Joshi *et al.* 1991).

La liofilización es un método que permite la deshidratación de la célula a través de la sublimación del hielo, y es continuada hasta obtener un bajo contenido de humedad residual, para dar lugar a un material compacto que se disuelve posteriormente con facilidad; esta técnica fue ampliamente usada en un principio con cultivos de hongos (Tello *et al.* 1991). Los crioprotectores usados para la liofilización son la leche descremada (medio comercial), suero, peptona y varios azúcares y mezclas de estos, esterilizados en autoclave a 121°C durante 10 minutos, a excepción del suero y otras sustancias sensibles al calor, que son esterilizadas por filtración (Smith y Onions 1994).

A partir del crecimiento del hongo en un tubo de ensayo, se adicionan 5 ml de leche descremada al 10% (Ref. Difco); posteriormente, se agita en vortex durante un minuto para remover las esporas y se vierten 0,5 ml en cada uno de los diez frascos viales de vidrio (capacidad de 4 cc), previamente esterilizados y rotulados. Si el crecimiento del hongo se obtiene en caja de Petri, se toma suficiente cantidad de esporas con un asa en argolla y se llevan al tubo de ensayo que contiene los cinco mililitros del crioprotector. Finalmente, se tapa cada frasco vial con un tapón de caucho estéril, de forma que el cierre no quede hermético, es

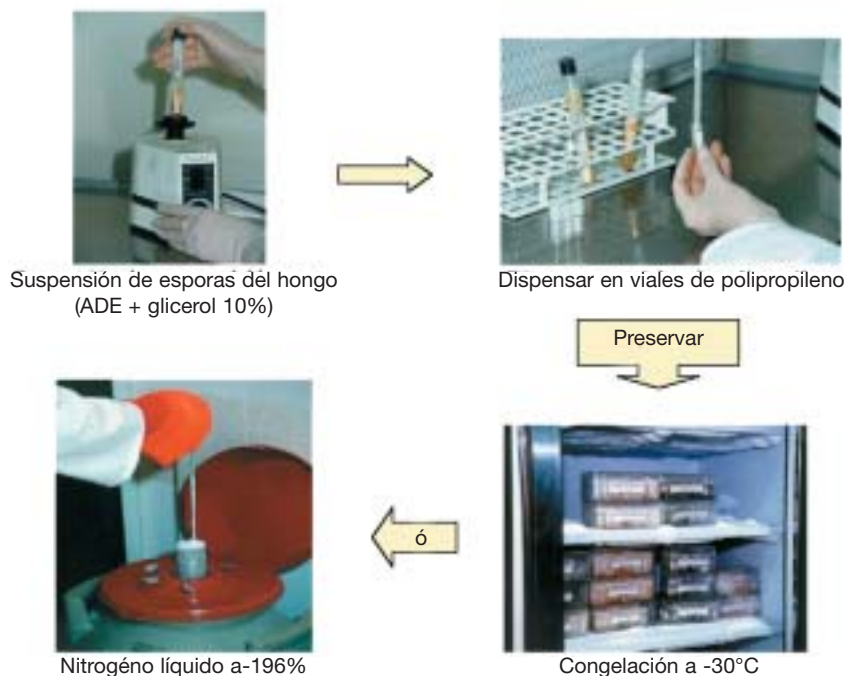


Figura 2. Procedimiento para la criopreservación de microorganismos.

decir, que los espacios del tapón queden expuestos para facilitar el intercambio de gases durante el proceso de liofilización (Fig. 3). La liofilización del material biológico se realizó en el equipo LABCONCO, con los siguientes parámetros: temperatura de congelación -35°C ; temperatura de calentamiento 12°C ; velocidad en la que ocurre la sublimación: $0,8^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$; duración del proceso: 24 horas (Fig. 3).

Se recomienda que los frascos viales conserven el mismo tamaño, para que el sellado al vacío sea exitoso; una vez finalizado el proceso de liofilización, los frascos viales deben sellarse inmediatamente con los agrafes, para evitar que los aislamientos ganen humedad; se debe desinfectar el equipo liofilizador con detergentes como Extrán o Sanivec, antes y después de cada proceso, y no se recomienda el uso de alcohol o hipoclorito porque pueden maltratar u oxidar el equipo.

Debido a los cambios osmóticos a los cuales es sometida la spora en el proceso de la liofilización, se deben tener en cuenta el crioprotector, el rango de enfriamiento y de calor requerido durante la deshidratación, la humedad residual, el período de liofilización y

las condiciones de almacenamiento, entre otras, ya que estos factores pueden afectar la viabilidad y la estabilidad de los microorganismos (Smith y Onions 1994).

Evaluación biológica en los procesos de liofilización y criopreservación

El material biológico liofilizado se sometió a pruebas de viabilidad y contenido de humedad antes de ser almacenado a temperatura ambiente durante doce meses. El porcentaje de humedad se evaluó tomando tres frascos viales al azar y, con la ayuda de una espátula, se vertió el contenido en una bandeja; la humedad se determinó en un desecador de luz halógena (Ref. Mettler toledo), empleando dos repeticiones por lectura, con tiempos de secado de tres minutos cada uno (Fig.3).

La viabilidad de los aislamientos se evaluó adicionando 0,5 ml de agua destilada estéril o agua peptonada al frasco vial con el microorganismo liofilizado; luego de 30 minutos de hidratación, se agitó en vórtex durante un minuto y se realizó la siembra masiva en un medio enriquecido según los requerimientos del mi-

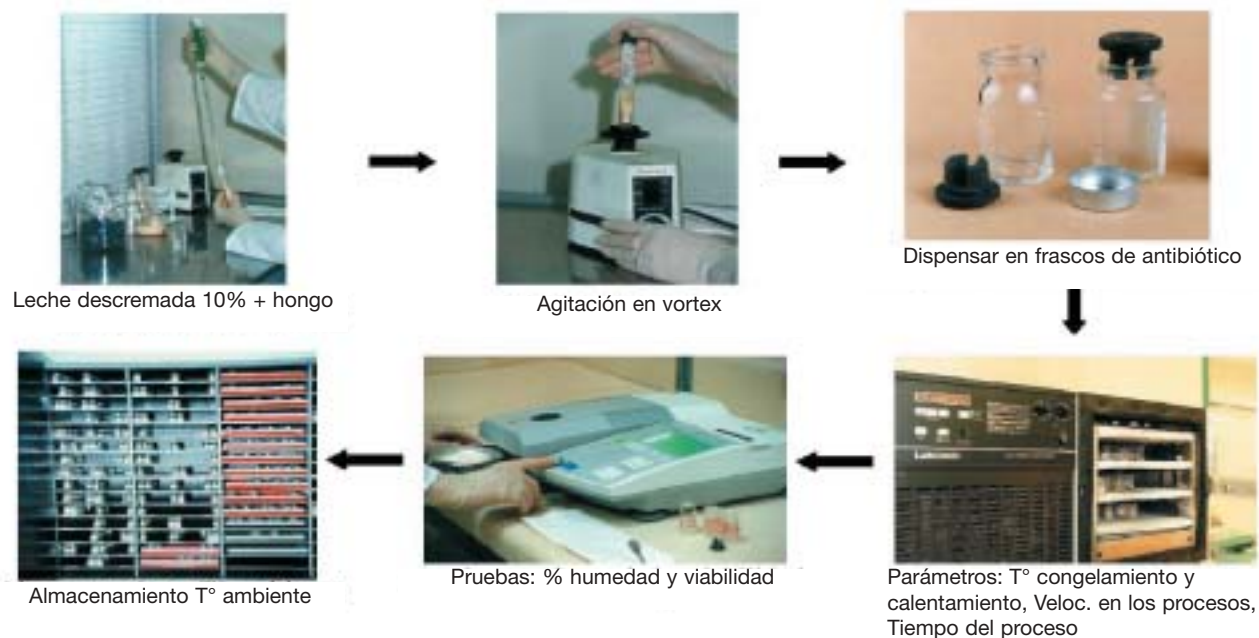


Figura 3. Procedimiento para la liofilización de microorganismos.

croorganismo por recuperar; al cabo de 5-8 días, se observó el crecimiento del microorganismo, registrando la viabilidad de la siguiente manera:

- +: Se recuperó el aislamiento (crecimiento puro y con esporulación)
- : No se recuperó el aislamiento
- d: Débil crecimiento micelial y esporulación
- c: Aislamiento contaminado

El contenido final de agua residual en el material liofilizado puede interferir en la conservación del microorganismo, causando la muerte celular o mutaciones por daño en el ADN; así, el contenido de humedad no puede ser menor del 1% ni superior al 5% (Smith y Onions 1994).

Para la recuperación o reconstitución del material biológico preservado en glicerol al 10% a temperaturas bajo cero o en nitrógeno líquido, se sometieron los aislamientos a choque térmico, durante 15-30 minutos, en baño maría a 37°C y se realizó la siembra masiva en un medio enriquecido. Es recomendable que el material que se ha sometido a choque térmico no sea congelado nuevamente, ya que en este intento la formación de cristales podría ocasionar el rompimiento de la célula.

Sistematización de la colección de hongos entomopatógenos

Considerando que la colección de Cenicafé constituye un aporte a la comunidad científica, se creó una base de datos en el programa Microsoft Access (Office 97), con toda la información concerniente al aislamiento y con un sistema de búsqueda que facilita al usuario un registro ágil y oportuno, relacionado con el hospedante, orden, familia, género y cepa, entre otras opciones.

Conclusión

La colección de hongos entomopatógenos del Cenicafé cuenta con 131 aislamientos de *B. bassiana*, 55 de *M. anisopliae*, seis de *Paecilomyces lilacinus* y uno de *Fusarium* sp. Cenicafé ha puesto este valioso recurso biológico a disposición de las diferentes instituciones que desarrollan investigación con hongos entomopatógenos, así como también a instituciones involucradas con la producción, formulación o aplicación en el campo de productos biológicos con base en estos entomopatógenos.

La colección de hongos del Cenicafé se encuentra debidamente registrada, identificada, preservada y sistematizada, lo que se constituye en un germoplasma de gran valor, con diversas aplicaciones en el cam-

po de la investigación. Adicionalmente, se cuenta con un libro en el que se registran las solicitudes de los aislamientos por parte de las instituciones; el formato cuenta con las especificaciones de cantidad entregada, forma de preservación del aislamiento, solicitante, fecha de entrega y fecha de devolución, ya que los aislamientos que se retiran del cepario son recuperados de nuevo, con el fin de evitar la pérdida de este material.

El material biológico suministrado a dichas entidades ha sido preservado a través de la técnica de almacenamiento en glicerol al 10%, a -25°C, y su recuperación ha sido exitosa. En cuanto al material biológico liofilizado y almacenado a 25°C, el hongo *B. bassiana* presentó en general buena viabilidad; sin embargo, el porcentaje de humedad fluctuó entre 1,3 y 8,5% (Cuadro 1). Es importante observar la viabilidad de los aislamientos con humedad superior al 5% a través del tiempo. En cuanto a *M. anisopliae*, hasta el presente no se ha observado una respuesta homogénea en la recuperación de los aislamientos liofilizados (Cuadro 1).

El mantenimiento de los aislamientos por subcultivos seriados se recomienda para las colecciones pequeñas, en las que el mantenimiento de microorganismos se hace a corto plazo; sin embargo, la periodicidad de esta actividad está sujeta a la variación en las características fisiológicas y morfológicas, debido a que no hay suspensión del metabolismo. Además, puede ocurrir contaminación por esporas aéreas o presencia de ácaros, por lo que se requiere una continua supervisión por parte de un especialista, para asegurar que el microorganismo no sea mezclado o reemplazado por un contaminante (Tello *et al.* 1991).

Literatura citada

- Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. Minneapolis, US, Burgess Publishing Company. 225 p.
- Commonwealth Mycological Institute. 1979. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria 61(601-610).
- Domsch, KH; Gams, W; Anderson, TH. 1980. Compendium of soil fungi. London, UK, Academia Press. 895 p.
- Estrada, MN; Vélez, PE; López, JC. 1997. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48(1):59-65.
- Heckly, RJ. 1978. Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* (24):1-53.
- Jiménez, J 2002. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé* 43(3):84-98.

Cuadro 1. Viabilidad y porcentaje de humedad en los aislamientos liofilizados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* después de doce meses de almacenamiento.

Aislamientos	Viabilidad	% de viabilidad
Bb 9003	c	--
Bb 9017	-	0
Bb 9019	+	100
Bb 9024	+	100
Bb 9108	+	100
Bb 9119	+	100
Bb 9020,9503,9316	+	100
Bb 9304,9027,9228,9232,9002,9301	+, +,+,d,+,+	83,3
Bb 9004,9225,9208,9105,9230	+,+,d, +, +	80,0
Bb 9012	d	--
Bb 9501	+	100
Bb 9216	+	100
Bb 9231	+	100
Bb 9309,9201	+	100
Bb 9009,9603	d, +	100
Bb 9106,9010,9024,9210	+	100
Bb 9003,9028,9026	c, +, +	66,7
Bb 9006,9117,9019	+	100
Bb 9112,9018	+	100
Bb 9105,9402	+	100
Bb 9116	+	100
Bb 9801	+	100
Ma 9222	-	--
Ma 9101	-	--
Ma 9108	-	--
Ma 9202,9401,9236	-,-,-	--
Ma 9224	-	--
Ma 9231	-	--
Ma 9106	-	--
Ma 9003	-	--
Ma 9102	-	--
Ma 9004	c	--
Ma 9106,9217,	-,-	--
Ma 9103	-	--
Ma 9105	+	100
Ma 9232	+	100
Ma 9205	-	--
Ma 9107	+	100
Ma 9218	+	100
Ma 9304	-	100
Ma 9237	d	100
Ma 9219	-	--
Ma 9203	d	100
Ma 9215	-	--
Ma 9001	-	--
Ma 9212	+	100
Ma 9236	-	--
Ma 9235	-	--
Ma 9234	+	100

+: Se recuperó el aislamiento; -: No se recuperó el aislamiento; d: Aislamiento con crecimiento micelial y esporulación débil; c: Aislamiento contaminado.

-
- Joshi, LM; Wilcoxson, RD; Gera, SD; Chatterjee, SC. 1991. *In* Maintenance of Microorganisms and Culture Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2 ed. 308 p.
- Kirsop, BE; Doyle, A. 1991. Maintenance of microorganisms and culture Cells. A manual of laboratory methods. 2 ed. London, UK, Academic Press. p 180-200.
- Posada, FJ; Vélez, PE. 1997. Registro de hospedantes y aislamientos de *Beauveria bassiana* en la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé, Colombia. Manejo Integrado de Plagas 46: 50-64.
- Smith, D; Onions, AHS. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. IMI Technical handbooks No.2. 2 ed. CABI International. International Mycological Institute. United Kingdom, Egham. 122 p.
- Snell, JJS. 1991. General introduction to maintenance methods. *In* Kirsop, BE; Doyle, A. eds. Maintenance of microorganisms and culture cells. A Manual of Laboratory Methods. 2 ed. London, UK, Academic Press. p. 153-180.
- Tello, TC; Fisac, R; Vares, F. 1991. Conservación de microorganismos fitopatógenos: Hongos. *In* Manual de laboratorio, Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos. Madrid, ES, Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Dirección general de sanidad de la producción agraria. p. 88-96.
- Tuite, J. 1969. Plant pathological methods fungi and bacteria. Minneapolis, US, Burgess. p. 92-112.
- Valdés, BE; Vélez, PE. 1998. Caracterización bioquímica cualitativa de aislamientos de *Beauveria bassiana* de una colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé. Revista Colombiana de Entomología 24(1-2):61-67.
- Velez, PE; Benavides, M. 1990. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya (Nariño), Colombia. Cenicafé 4(12):50-57.