

FICHA TÉCNICA **CB-30**

LIOFILIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

Los conidios de los hongos, al igual que las semillas de las plantas, sobreviven en condiciones de sequía y permanecen en estado de latencia hasta que las condiciones de humedad son aptas para su germinación. Algunos de los métodos de preservación a largo plazo para los hongos microscópicos se basan en la deshidratación de las células (liofilización) con el objetivo de reducir su actividad metabólica al mínimo; bajo estas condiciones los hongos sobreviven por periodos de tiempo prolongados (Smith y Onions, 1994).

La liofilización es un proceso mediante el cual el agua es removida del interior de las células por sublimación, que consiste de tres pasos: (1) el precongelado de la muestra que garantiza una estructura sólida (ultracongelación a -50°C); (2) secado primario durante el cual el agua congelada es removida; y (3) el segundo secado que elimina el agua restante de la muestra. Todo esto permite la conservación del material por largos periodos de tiempo (ATCC, 1991).

Esta técnica es una de las más empleadas por las colecciones de cultivo que ofrecen servicios de suministro de cepas microbianas (Humber, 2012), es relativamente fácil de realizar y los cultivos liofilizados requieren poco mantenimiento y espacio durante su almacenamiento (Mier *et al.*, 2005; Humber, 2012). Es una estrategia efectiva para casi todos los hongos conidiales, como Ascomycetos y Basidiomycetos. No es aplicable para los hongos con alto porcentaje de agua o grandes volúmenes vacuolares en sus células, como los Oomicetos y Entomophthorales; lo que explica el

por qué los conidios pueden tolerar mejor la liofilización que las hifas vegetativas (Humber, 2012).

PREPARACIÓN DEL MATERIAL

1.- Los hongos se propagan en tubos de ensayo con medio de cultivo sólido inclinado, generalmente Sabouraud suplementado con Extracto de levadura al 1%; los cuales son incubados a 27°C durante dos semanas, o hasta alcanzar una cantidad abundante de conidios (**Fig. 1**).



Figura 1. Cepa de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. esporulados.

2.- A partir de los cultivos maduros, se prepara una suspensión de conidios en 5 mL de Tween 80 al 0.05%, se homogeniza y se transfiere a un tubo Falcon™ de 15 mL, se agita nuevamente y se centrifuga a 4000 rpm durante 7 min para obtener un botón de conidios.

3.- Se realiza el lavado del botón de conidios con la finalidad de eliminar el micelio, se adicionan 5 mL de agua destilada estéril, la suspensión es homogeneizada con ayuda de un vórtex y se centrifuga nuevamente a 4000 rpm durante 7 min (**Fig. 2**), se elimina el sobrenadante, este proceso se repite en dos ocasiones.

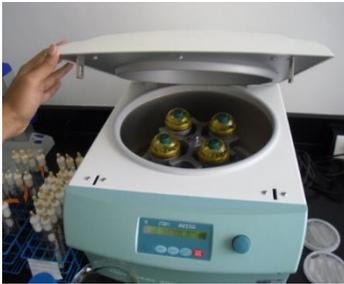


Figura 2. Centrifugación de las suspensiones conidiales.

4.- A los tubos con el botón de conidios se adicionan 2 mL de leche descremada Svelty® al 10% (previamente esterilizada a 121°C durante 5 min), se homogeniza con ayuda de un vórtex y se decanta en una botella serológica de vidrio con tapón de goma, previamente esterilizados (Montesinos-Matías *et al.*, 2015) (**Fig. 3**). La leche descremada tiene la función de crioprotector, evita daños celulares durante el pre congelado, Smith y Onions, (1994) mencionan que es un protector adecuado para la liofilización.



Figura 3. Suspensión de conidios con leche descremada es colocada en botellas serológicas.

5.- Las botellas serológicas que contienen la suspensión del hongo se guardan en refrigeración durante 12 h, durante el almacenamiento los sacáridos (lactosa) conteni-

en la leche descremada ayudan a disminuir los efectos del cambio drástico de temperatura en la estructura de las membranas del hongo, debido al proceso de deshidratación. Por otro lado, las macromoléculas (lacto-albúmina y caseína) funcionan como agentes de carga y los aminoácidos contenidos en las mismas brindaran protección al reparar posibles daños subletales en las células, además de proporcionar energía al recuperar los cultivos (Tan *et al.*, 2007).

PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

1. Al finalizar el proceso de curado, transferir las botellas serológicas con las muestras a un ultracongelador de rodillos con etanol a -50°C por 20 min (precongelado) (**Fig. 4**).



Figura 4. Precongelado de las muestras a -50°C.

2.- En el equipo liofilizador se programa las condiciones de operación, se establecen la temperatura y el vacío, y una vez que se estabilizan, se colocan las muestras congeladas en las válvulas (**Fig. 5**), se verifica nuevamente que la temperatura y el vacío en el equipo se mantengan, en cada carga de las botellas serológicas. El proceso de secado ocurre entre 6 y 7 h, el contenido de humedad al finalizar la liofilización en este tiempo se recomienda que sea cercano al 1 ó 2% (Smith y Onions, 1994).



Figura 5. Secado del material a través de liofilización.

3.- Al concluir el proceso de liofilización, se sella la botella serológica con el tapón de goma (sin alto vacío) y la re-tapa metálica con una engarzadora de sellos. Finalmente se etiqueta la botella serológica con su respectivo acrónimo CHE-CNRCB y la fecha de secado (**Fig. 6**).



Figura 6. Sellado y etiquetado de muestras liofilizadas.

4.- Almacenar las botellas liofilizadas en refrigeración, preferentemente a 4°C (**Fig. 7**), si se mantiene a temperatura ambiente (25 °C), la viabilidad del hongo se pierde considerablemente (Humber, 2012).

RECUPERACIÓN DEL VIAL LIOFILIZADO

1.- En condiciones asépticas, desinfectar el tapón de goma con un algodón impregnado con etanol al 70% o una solución de NaClO al 1%.



Figura 7. Almacenamiento de las muestras liofilizadas a 4°C.

2.- Para rehidratar el cultivo, añadir directamente 1 mL de agua estéril con una jeringa a través del tapón. Como segunda opción, retirar el tapón de goma y adicionar el mismo volumen de agua con una micropipeta.

3.- Homogenizar suavemente la suspensión de conidios y dejar reposar de 10 a 15 min para permitir su rehidratación.

4.- Transferir una alícuota de 100 µL a una caja de Petri con medio de cultivo y distribuir en la superficie con una varilla acodada e incubar a 25 ± 2 °C (**Fig. 8**).



Figura 8. Inoculación de 100 µL de conidios rehidratados sobre medio de cultivo.

5.- Durante todo el desarrollo del hongo, se debe monitorear su viabilidad y pureza, para descartar contaminantes (**Fig. 9**).



Figura 9. Cepa de *Isaria* sp. recuperada de liofilización.

VENTAJAS

Método ampliamente utilizado para hongos conidiales, puesto que permanecen viables y estables por tiempos prolongados, entre 7 a 10 años (Smith y Onions, 1994).

El microorganismo permanece en un contenedor sellado, se reduce el riesgo de contaminación. Los cultivos liofilizados (cultivo no activo) tienen menos restricciones para su envío (grupo de riesgo 1, microorganismos no infecciosos para hongos entomopatógenos) a través de los diferentes servicios de paquetería (https://www.atcc.org/Guides/Mycology_Culture_Guide.aspx).

DESVENTAJAS

La inversión inicial en un equipo liofilizador, es elevada.

No es recomendable para hongos que producen pocos conidios o que no soporten el proceso de liofilización.

LITERATURA CITADA

- American Type Culture Collection, (ATCC). 1991.** Preservation methods: Freezing and freeze-drying. 2da. Ed., American Type Cultures Collection. Rockville Md.
- Humber, R.A. 2012.** Preservation of Entomopathogenic Fungal Cultures. pp. 317-328. *In:* Lacey, L.A. (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. 2da. Ed. Chapter X. Academic Press, London.
- Mier, T., C. Toriello, M.A. Ayala-Zermeño & H. Navarro-Barranco. 2005.** Conservación de Hongos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas Agrícolas. Ciencias Biológicas y de la Salud Cuadernos 51, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Montesinos-Matías, R., M.A. Ayala-Zermeño & A.M. Berlanga-Padilla. 2015.** Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Primera Edición. SENASICA.
- Smith, D. & A.H.S Onions. 1994.** The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2da. Ed., CAB International, London.
- Tan, C.S., C.W. van Ingen & J.A. Stalpers. 2007.** Freeze Drying Fungi Using a Shelf Freeze-Drier. *In:* Day JG, Stacey GN (eds). Methods in Molecular Biology™ 368, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Humana Press, New Jersey, USA, pp. 119-125.

AGRADECIMIENTOS

A los Maestros Marco D. Martínez Peña y Hugo C. Arredondo Bernal por la revisión previa a esta publicación.

Dr. Victor M. Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
Dr. Francisco Javier Calderón Elizalde
DIRECTOR EN JEFE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
Ing. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
M. en C. Guillermo Santiago Martínez
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M. en C. Jorge Antonio Sánchez González
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

Elaboraron:

Ing. José Carlos Rodríguez Rodríguez
M. C. Angélica María Berlanga Padilla
Dr. Miguel Ángel Ayala Zermeño
Dr. Roberto Montesinos Matías

SUBDIRECCIÓN DE CONTROL BIOLÓGICO

KM 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. C.P.
28110 TECOMÁN, COLIMA.
TEL. (313) 32 4 07 41 y 45
<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>

Sugerencia de como citar esta ficha:

Rodríguez-Rodríguez J.C., A.M. Berlanga Padilla, M.A. Ayala-Zermeño y R. Montesinos-Matías. 2023. Liofilización de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-28, 4 p.