



Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril

Lourdes Bueno y Ricardo Gallardo

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Ciudad de la Habana, Cuba

Resumen

Algunos métodos han sido utilizados para el mantenimiento de la colección de cultivos fúngicos y la elección de uno u otro se ha hecho sobre la base de que asegure la estabilidad genética de las cepas y sus características fenotípicas. En este trabajo se empleó el método de preservación en agua destilada estéril por ser reconocido en la literatura como un método sencillo, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de cultivos fúngicos por periodos prolongados.

Se conservaron 26 cepas de los géneros y especies siguientes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor griseocyanum*, *Syncephalastrum* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii*.

La selección de cultivos bien desarrollados y el inóculo suficiente (consistente en esporas e hifas) depositados en frascos con agua destilada estéril aseguraron el 100% de supervivencia de estos microorganismos en dicho sustrato durante dos años; a la vez que no se observaron cambios aparentes en la morfología y caracteres macroscópicos en ninguno de los cultivos estudiados.

Palabras clave

Preservación, Hongos filamentosos, Agua destilada

Filamentous fungi preservation in distilled water

Summary

Some methods for keeping the fungal Culture Collection have been used. However, the choice of either one on the basis that must ensure the cultural genetic stability and its phenotypic characteristics.

In this work the preservation method in distilled water recognized in the literature as a single, economic and certain method that guarantee the survival of fungus cultures for long periods was used.

26 strains of genus and species: *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme*, *Mucor griseocyanum*, *Syncephalastrum* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma koningii* were preserved.

Enough inoculum from well developed cultures (mainly spores and hyphae) poured in flasks with sterile distilled water warranted a 100% of survival of those microorganisms for two years. At the same time no apparent changes were observed in respect to morphology and macroscopic features.

Key words

Preservation methods, Filamentous fungi, Distilled water

Entre los diversos procedimientos de conservación utilizados para hongos, se destacan como favoritos el cultivo periódico en cuñas de agar, bajo aceite mineral, conservación de esporas en tierra, arena o *silica gel*, cepas liofilizadas, congelación en nitrógeno líquido y en agua destilada [1-19]

La elección de los métodos tiene en cuenta varios factores, según sea el objetivo de la colección, así pues una pequeña colección docente difiere de aquellas que

son depositarias nacionales. Si por el contrario el objetivo es clasificar taxonómicamente los cultivos se precisan métodos que garanticen la estabilidad morfológica de los microorganismos. Así mismo una colección de interés para la industria debe hacer énfasis en los métodos que mantengan la estabilidad genética [13-15].

El vertiginoso progreso en materia de conservación de microorganismos no ha impedido que la conservación en agua destilada estéril siga acaparando un lugar de preferencia por ser este un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por periodos prolongados, a la vez que evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros [10,12].

De ahí que nuestro objetivo al emplear el método de conservación en agua destilada estéril sea el de garantizar el mantenimiento de los cultivos de hongos filamentosos oriundos de los derivados de la caña de azúcar de Cuba por periodos prolongados, sin que se produzcan cambios en sus características morfológicas y fisiológicas.

Dirección para correspondencia:

Dra. Lourdes Bueno Rosell
ICIDCA, Vía Blanca 804, PO Box 4026 San Miguel
de Padrón, Ciudad de la Habana, Cuba
Tel.: +537-983003/05 ; Fax: + 537-338236
E-mail: icidca@ceniai.inf.cu

Aceptado para publicación el 19 de mayo de 1998

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 26 cepas de mohos de los géneros y especies siguientes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Fusarium sp.*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor griseocyanum*, *Syncephalastrum sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii*.

La técnica empleada fue la de pase periódico en agua destilada estéril. La suspensión inóculo se obtuvo a partir de un cultivo fúngico bien desarrollado sobre caña de agar malta, a la que se le añadió 9 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó con el auxilio de un agitador de cristal. La concentración alcanzada fue de 1×10^9 UFC/ml

A un frasco de vidrio (diámetro 1,5 x 6,5 cm de alto) con boca de rosca y tapa de baquelita o de metal contentivo de 5 a 7 ml de agua destilada estéril se transfirió 1 ml del inóculo y se almacenó en refrigeración



Figura 1. Frascos con agua destilada y cultivos fúngicos.

(aprox. 4°C) durante dos años (Figura 1).

La viabilidad se realizó a la hora cero, a los seis meses y a los dos años según el principio de la metodología empleada por Malik, [8]. El medio de cultivo empleado fue Rosa de Bengala.

La supervivencia después de los dos años se determinó por medio de la siembra en agar glucosado de Sabouraud e incubación a 30°C durante siete días.. Se consideró viable un cultivo cuando hubo crecimiento. El crecimiento se evaluó según el examen macroscópico y microscópico del cultivo.

RESULTADOS

La fiabilidad del método ensayado en nuestras condiciones quedó demostrada al verificarse que los cultivos autóctonos aislados de los derivados de la caña de azúcar de Cuba lograron ser viables después de dos años en agua destilada estéril y que los porcentajes de viabilidad se mantuvieron dentro de parámetros considerados como acept-

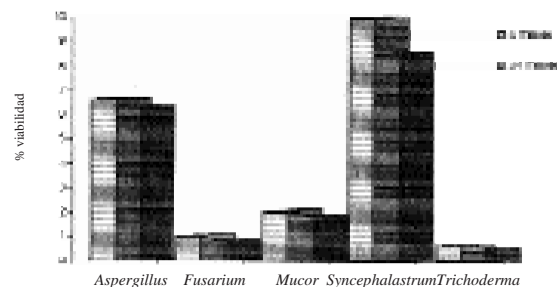


Figura 2. Viabilidad de los hongos filamentosos preservados en agua destilada estéril durante dos años.

tables (0,1%) (Figura 2).

Como se advierte en la tabla 1, el 100 % de *Aspergillus niger*, *A. candidus*, *Fusarium sp.*, *F. moniliforme*, *M. griseocyanum*, *Syncephalastrum sp.*, *Trichoderma sp.*, *T. harzianum* y *T. koningii*, sobrevivieron en este método de conservación.

Asimismo se constató que sus caracteres macro y micromorfológicos no sufrieron variaciones que se hicieran perceptibles a simple vista, esto se evidencia en las Figuras 3 a 8. Tampoco se encontró contaminación con ácaros, bacterias u otros hongos.

Tabla 1. Supervivencia de los cultivos en agua destilada estéril almacenada durante 2 años.

Género y especies	Cultivo conservado / Cultivo supervivencia
<i>Aspergillus niger</i>	12/12
<i>Aspergillus candidus</i>	1/1
<i>Fusarium sp.</i>	1/1
<i>Fusarium moniliforme</i>	7/7
<i>Syncephalastrum sp.</i>	1/1
<i>Trichoderma sp.</i>	1/1
<i>Trichoderma harzianum</i>	1/1
<i>Trichoderma koningii</i>	1/1
<i>Mucor griseocyanum</i>	1/1
Total	26/26 (100%)

DISCUSIÓN

Los porcentajes de viabilidad expresados en la figura 1, evidencian que el número de esporas viables a los dos años fue suficiente para asegurar la existencia de los cultivos. Asimismo se vio que los porcentajes estuvieron por encima de 0,1%, cifra planteada por Heckly [3] como excelente para garantizar viable un cultivo liofilizado, método considerado ideal.

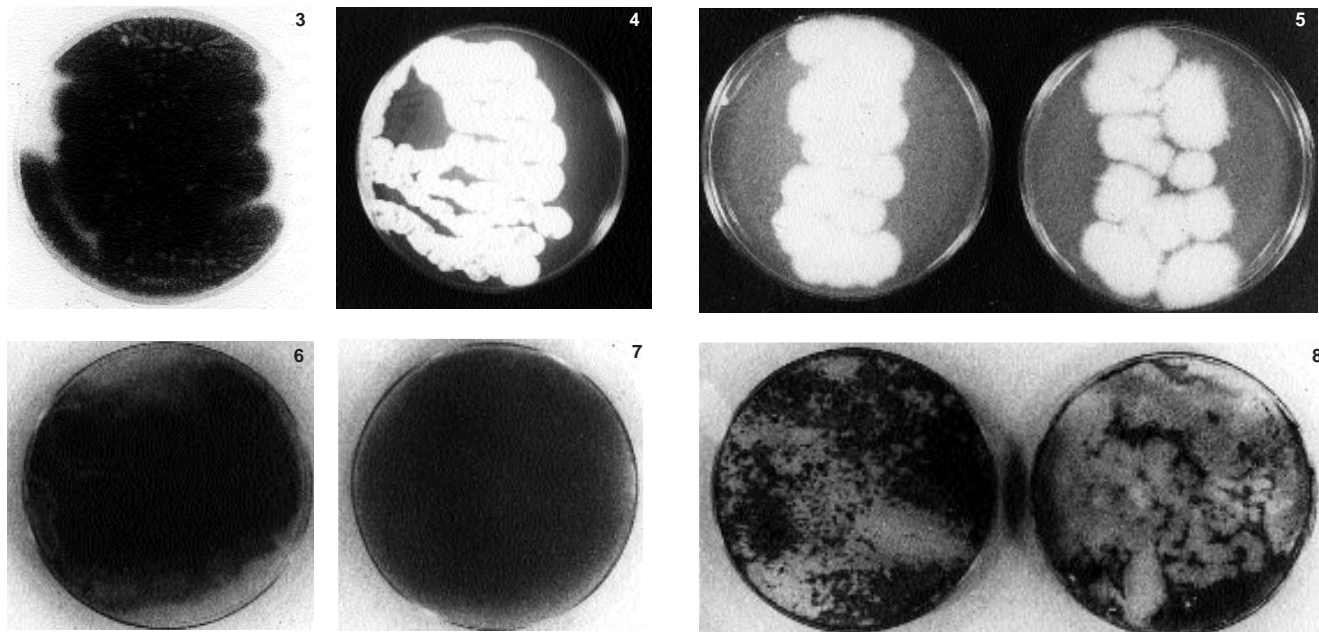
Como se observa en la tabla 1 el porcentaje de supervivencia fue de 100 % para todos los géneros y especies evaluados, cifra que superó la encontrada por Mc Ginnis y Padhye [10] quienes comunicaron que el 93% de los cultivos de hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos sobrevivieron en agua destilada estéril durante periodos largos.

Por otra parte, Rodríguez, Lírio y Lacaz [12] hallaron que la supervivencia de los hongos filamentosos conservados en agua destilada por mas de dos años fue de 91-98%. Similar porcentaje (87%) de supervivencia informa Szakacs [18] cuando conservó liofilizados algunos cultivos fúngicos, mientras que Hoffmann [5] encontró un 90% de supervivencia cuando preservó basidiomicetos en nitrógeno líquido. Pasarell y Mc Ginnis [11] encontraron que el 97,7% de los ascomicetos, basidiomicetos, hongos imperfectos y zigomicetos lograron sobrevivir cuando se conservaron a -70°C. También Smith y Onions [14] demostraron que deuteromicetos, zigomicetos y ascomicetos conservados en agua destilada sobrevivieron durante dos a cinco años.

Nuestros resultados coinciden en lo fundamental con los alcanzados por esos autores, aun cuando en algunos casos los métodos no fueron los mismos.

El evitar el pleomorfismo y la contaminación con ácaros está entre las bondades que se atribuyen a este método de conservación; a la vez que se reconoce que muchas cepas fúngicas que habían perdido sus caracteres macroscópicos por los pases sucesivos volvían a recuperar estas cuando se conservaron en agua destilada [10,12].

En nuestro caso se pudo advertir semejante con-



Figuras 3-8. Cultivo de diferentes hongos después de dos años en agua destilada. 3: *Aspergillus niger*; 4: *Aspergillus candidus*; 5: *Fusarium moniliforme*; 6: *Mucor* sp; 7: *Syncephalastrum*; 8: *Trichoderma harzianum*.

ducta, lo que se hizo evidente cuando se observaron los cultivos fúngicos recuperados después de dos años de preservados en agua destilada estéril.

CONCLUSIONES

La conservación en agua destilada estéril de cepas autóctonas de *A. niger*, *A. candidus*, *Fusarium* sp, *F. moniliforme*, *M. griseocyanum*, *Syncephalastrum* sp., *Trichoderma* sp. *T. harzianum* y *T. koningii* aseguró una

viabilidad del 100 % de los cultivos durante dos años. No se encontró contaminación con bacterias ni ácaros. No se advirtió a simple vista cambios macromorfológicos en los cultivos.

Bibliografía

- Bond CJ. Cryopreservation of yeast cultures. In *Methods in Molecular Biology*, Vol 38, Chapter 5: Cryopreservation and freeze-drying protocols. Day JG, Mc. Lellon MR (Eds.). Totowa-NJ, Humana Press Inc., 1995.
- Ghera RL. Methods for general and molecular bacteriology. Gerhardt B, Murray RgE, Woodwa (Eds.?). Krigner. Asm. Chapter 12: Culture preservation. 1994; 278-292.
- Heckly R.J. Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv Appl Microbiol* 1961; 3: 1-76.
- Henry J, Kirsop B. Cryopreservation of yeasts in polypropylene straws. *WFCC* 1989; Public. N°3.
- Hill LR. Preservation of microorganisms. Norris JR, Richmond MH (Eds.). *Assays in Appl Microbiol*, 1981.
- Hoffmann P. Cryopreservation of Basidiomycete cultures. *Mushroom Science XII, Parte I*, 1989.
- Kirsop BE. Maintenance of yeasts. In *Maintenance of microorganisms* (2nd ed.), London, Academic Press, 1991.
- Malik KA and Hoffmann P. Preservation and storage of biotechnologically important microorganisms. *Chimicaogy, Ciudad?*, 1989.
- Malik KA. Freeze-drying of microorganisms using a simple apparatus. *W J Microbiol Biotechnol* 1992; 8: 76.
- Malik KA and Hoffmann P. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. *W J Microbiol Biotechnol* 1993; 9: 372.
- Mc Ginnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol* 1974; 28: 218-222.
- Pasarell L, Mc Ginnis MR. Viability of fungal culture maintained at -70°C. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1000- 1004.
- Rodríguez Elaine G, Lirio Vanda, Lacaz CS. Preservacao de fungos e Actinomicetos de interesse médico em agua destilada. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34: 159-165.
- Smith D. Maintenance of fungi. In: *Maintenance of microorganisms*. London, Academic Press, 1984.
- Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. *IMI, Technical Handbooks N°2* (2nd ed.). Egham, CAB international, 1994.
- Smith D, Kolkowski J. Maintaining cultures for biotechnology and industry. *Fungi*. Chapter 6. London, Academic Press, 1996.
- Snell JJS. General introduction to maintenance methods. In: *Maintenance of microorganisms*. London, Academic Press, 1984.
- Stockdale PM, Smith D, Campbell CK. *Medical mycology*. Evans EQV, Richardson D (Eds.). London, IRL Press, 1989.
- Szakacs G. Aspects in development of microbial culture collection. *Acta Biochimic Biophysica Academic Scienturum Hungaricae* 1984; 19: 616.
- Thomas V, Smith D. Cryogenic light microscopy and the development of long term cryopreservation techniques for fungi. *Outlook on Agriculture* 1984; 23: 163-167.
- Uruburu F. La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y otros Bancos de Datos de Microorganismos. Apoyo a la industria. *Industria farmacéutica* 1991; Marzo-Abril.