

# Agar detergente semisólido: una alternativa para la conservación *ex situ* de *Cladosporium* spp. (Ascomycota: Cladosporiaceae)

## Semi-solid detergent agar: an alternative for the conservation *ex situ* of *Cladosporium* spp. (Ascomycota: Cladosporiaceae)

Ian Pérez Ramírez<sup>1,\*</sup>, Kenia Caridad Sánchez Espinosa<sup>1</sup>, Teresa Irene Rojas Flores<sup>1</sup> y Michel Almaguer Chávez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25, N° 455, e/ I y J, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. C.P. 10400.

\*Autor para correspondencia (e-mail: [iperez@fbio.uh.cu](mailto:iperez@fbio.uh.cu))

### RESUMEN

El género *Cladosporium* es ubicuo y tiene una amplia representación ambiental. Para la conservación de cepas de este género fúngico se han utilizado varios métodos de elección, entre los que se encuentran la criopreservación y la liofilización. Sin embargo, existen otros métodos alternativos y complementarios que disminuyen los costos de conservación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de la conservación de 92 cepas de *Cladosporium* en el medio Agar Detergente Semisólido (agar bacteriológico al 0,2 %, Tween 80 al 0,05 % y 100 ml de agua destilada estéril). Se determinó viabilidad, pureza e integridad morfológica hasta tres años posteriores a la conservación inicial. Para la conservación se utilizaron tubos Eppendorf™ de 1,5 ml con 1 ml de medio, a los que se inocularon esporas obtenidas a partir de un cultivo de 7 días en Papa Dextrosa Agar y se mantuvieron a 4 °C. Durante el período evaluado, las cepas mantuvieron la viabilidad con valores superiores al 90 %, por lo que este puede ser un método alternativo para la conservación de cepas de *Cladosporium* a corto o mediano plazo.

**Palabras clave:** cultivos microbianos, hongo, preservación de microorganismos, viabilidad

### ABSTRACT

The genus *Cladosporium* is ubiquitous and has a broad environmental representation. For the conservation of strains of this fungal genus, several methods of choice have been used, among which are cryopreservation and lyophilization. However, other alternative and complementary methods reduce conservation costs. The purpose of this investigation was to evaluate the feasibility of the conservation of 92 strains of *Cladosporium* in the medium Semisolid Detergent Agar (0.2 % bacteriological agar, 0.05 % Tween 80 and 100 ml of sterile distilled water). Viability, purity and morphological integrity were determined up to three years after initial conservation. For conservation, 1.5 ml Eppendorf™ tubes with 1 ml of medium were used, which were inoculated with spores obtained from a 7-day culture in Papa Dextrose Agar and kept at 4 °C. During the evaluated period, the strains maintained viability with values higher than 90 %, so this can be an alternative method for the conservation of strains of *Cladosporium* in the short or medium term.

**Keywords:** microbial cultures, fungus, preservation of microorganisms, viability

**Citación:** Pérez, I., Sánchez, K.C., Rojas, T.I. & Almaguer, M. 2021. Agar detergente semisólido: una alternativa para la conservación de cepas de *Cladosporium*. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 42: 203-207.

**Recibido:** 13 de agosto de 2020. **Aceptado:** 23 de diciembre de 2020. **Publicado en línea:** 13 de agosto de 2021. **Editor encargado:** Milay Cabarroi.

### INTRODUCCIÓN

La elevada variedad genética y fisiológica de los hongos filamentosos ha motivado una preocupación por su conservación *ex situ* (Hawksworth 2001). Se han descrito varios métodos que garantizan su mantenimiento en las colecciones de cultivos microbianos, con el objetivo de garantizar su viabilidad, pureza, integridad morfológica, fisiológica y genética (González & Jiménez 2013). El género *Cladosporium* Link tiene una amplia distribución ecológica y muchas de sus especies se consideran patógenos de plantas y humanos (Almaguer & al. 2014). Varias colecciones microbianas contienen cepas de *Cladosporium*, las cuales se han utilizado en estudios biotecnológicos, ecológicos y taxonómicos (Bensch & al. 2012, 2018, Sánchez & Almaguer 2018).

Según el tiempo que permanecen viables los microorganismos, se definen métodos de conservación a largo, mediano y corto

plazo (Weng & al. 2005). La liofilización y la criopreservación, son métodos de elección o conservación a largo plazo que permiten el mantenimiento de cultivos fúngicos viables por períodos superiores a los diez años. Aunque se consideran métodos de elección, el equipamiento y los insumos necesarios son costosos. Por otro lado, existen métodos alternativos simples y baratos que no requieren de equipos especializados (Nakasone & al. 2004), tales como la conservación en agua destilada y secado en gel de sílice, en perlas de alginato y en papel de filtro, los cuales se emplean en los cultivos con gran cantidad de esporas.

El Agar Detergente Semisólido (ADS) es un medio diseñado por Pitt (1973) para la inoculación de *Aspergillus* P. Micheli y *Penicillium* Link que se ha utilizado ampliamente (Klich & Pitt 1988, Pitt 2000, Samson & al. 2014). Como las esporas de estos géneros son hidrófobas y muy pequeñas, la inoculación

es más satisfactoria a partir de suspensiones semisólidas de esporas en agar (0,2 %) y detergente (0,05 %). Esto evita la formación de colonias de esporas individuales que se separan de los inóculos en masa. En el Laboratorio de Micología Ambiental de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana se ha comprobado que el uso del medio ADS para otros géneros también es factible y que las cepas se mantienen viables en los tubos por diferentes periodos de tiempo. Esto indica que este medio pudiera servir como un método alternativo de conservación a mediano plazo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de la conservación de 92 cepas de *Cladosporium* en el medio ADS durante el período de enero de 2016 hasta enero de 2020.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 92 cepas de *Cladosporium* pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología (CCMFB). La conservación inicial de las cepas se realizó en enero de 2016 (24 cepas) y octubre de 2018 (68 cepas). Se utilizaron tubos de polipropileno Eppendorf™ de 1,5 ml con 1 ml de ADS estéril: agar bacteriológico al 0,2 %, Tween 80 al 0,05 % y 100 ml de agua destilada (Pitt 1973, Klich & Pitt 1988). A partir del arrastre del micelio aéreo de los cultivos puros de 7 días en Papa Dextrosa Agar (PDA) de cada cepa, se prepararon tres lotes de conservación. Posteriormente se mantuvieron a 4 °C.

Se comprobó la viabilidad, pureza e integridad morfológica de las cepas en enero, abril y octubre de 2016, enero y octubre de 2017, octubre de 2018, enero, abril, junio y octubre de 2019, y enero de 2020. En cada fecha las cepas del lote de comprobación, se inocularon en placas de Petri con PDA y se incubaron durante siete días a 28 °C.

Posteriormente se comprobó la textura y la coloración del micelio aéreo y vegetativo de cada colonia. A partir de las colonias se realizaron preparaciones en fresco con lactofenol y se observaron las características morfológicas en un Microscopio Biológico de campo claro *Trinocular Zoel modelo N-200M*. Adicionalmente, se realizaron microcultivos directamente del inóculo conservado (Riddel 1950). Además, se realizó una inspección visual periódica de los tubos donde se observó el estado de deshidratación de los mismos. También se determinó la presencia de crecimiento, contaminación y las características morfológicas del material conservado al microscopio estereoscópico.

En la última comprobación (enero de 2020) se observaron las características morfológicas del material conservado, para lo cual se realizaron preparaciones directas. Además, se calcularon los porcentajes de germinación en ADS mediante la determinación del promedio de conidios totales y promedio de conidios germinados, a través del conteo al Microscopio Biológico de campo claro *Trinocular Zoel modelo N-200M* en diez campos de visión.

Durante el proceso de comprobación, las cepas que se encontraban contaminadas se purificaron mediante la siembra

por estrías a partir de suspensiones de esporas en solución salina (0,85 g de NaCl, Tween 80 al 0,05 % y 100 ml de agua destilada). Después de comprobar las características culturales y morfológicas iniciales, las cepas se conservaron nuevamente.

## RESULTADOS

Las cepas conservadas mantuvieron elevados porcentajes de viabilidad (91,6-100 %). Solo dos viales del lote de comprobación se deshidrataron completamente (CCMFB-H667 y CCMFB-H676) durante la comprobación de octubre de 2018 (Figura 1A-B). Sin embargo, se pudieron recuperar en los dos lotes restantes. Los porcentajes de pureza para el total de las cepas oscilaron entre 86,9-100 %. Para el primer grupo de cepas conservadas los menores porcentajes se evidenciaron en las comprobaciones de enero de 2019 y octubre de 2019 (87,6 %) y para el segundo grupo en las comprobaciones de octubre de 2019 y enero de 2020 con 83,8 % y 82,2 %, respectivamente (Tabla I).

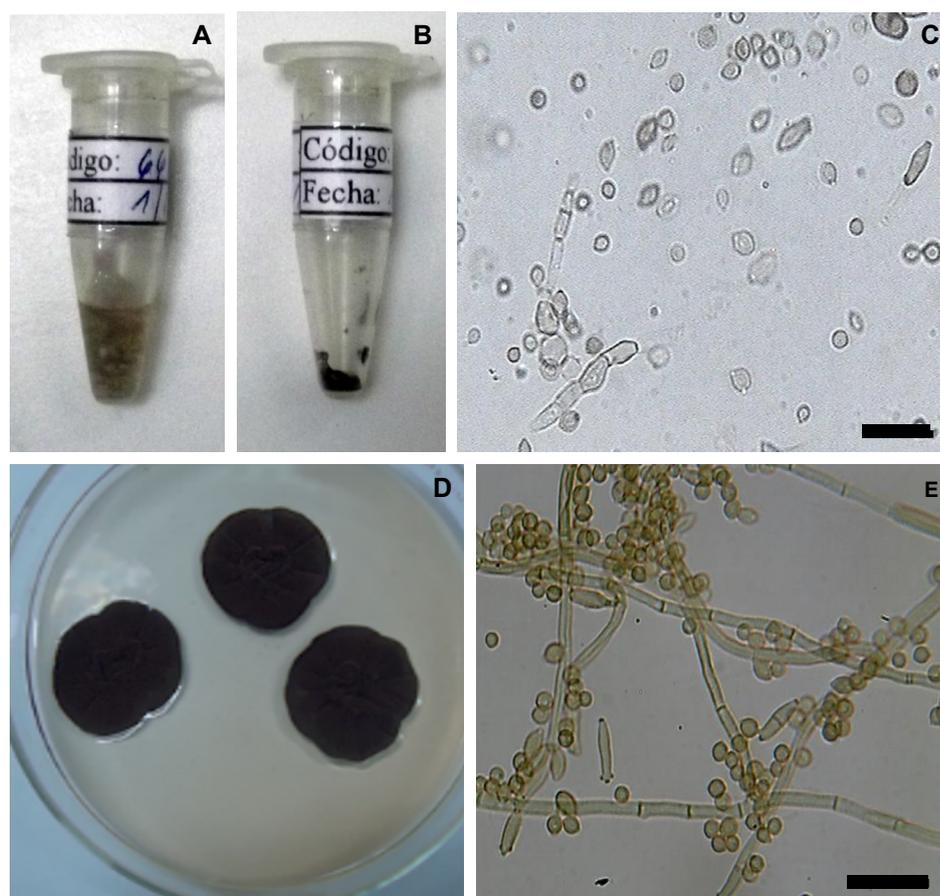
Al examinar directamente el material conservado en los viales se observaron fragmentos de hifas y conidios semiesféricos o elipsoidales de mayor tamaño, que ocasionalmente formaban cadenas. Además, el porcentaje de germinación en los conidios conservados de cada cepa no superó el 0,03 % (Figura 1C). Todas las cepas mantuvieron sus características morfológicas y culturales (Figura 1D-E).

## DISCUSIÓN

Los métodos elegidos para la conservación de hongos deben garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original y conserve las propiedades de importancia (Weng & al. 2005). En este sentido, los porcentajes de viabilidad superiores al 90 %, evidencian que el medio ADS es una alternativa para la conservación a corto o mediano plazo de *Cladosporium*. Varios autores informan porcentajes de recuperación entre 50-95 % en sílica gel, agua destilada estéril y cultivo inmerso en capa de aceite mineral por períodos de 3-12 meses, incluso 20 años (Capriles & al. 1989, Rodríguez & Gato 2010).

Para la elección de los métodos de conservación más adecuados, en relación con el número y valor de los cultivos, debe considerarse el tiempo a emplear por los curadores en la preservación inicial, manipulación y control periódico de las cepas (Singh & al. 2018). Al respecto, en este método los procedimientos son sencillos y requieren de la preparación de pocos materiales. Sin embargo, la pureza de las cepas conservadas puede afectarse durante la toma del inóculo en las comprobaciones sistemáticas. Esto se evidenció en las comprobaciones realizadas a las cepas de *Cladosporium* en abril de 2016, octubre de 2018, enero de 2019, octubre de 2019 y enero de 2020.

En el análisis directo del material conservado durante tres años en los tubos, se observaron fracciones de conidióforos o micelio en el medio debido a la manipulación mecánica del



**Fig. 1. A-B:** Viales eppendorf con suspensión de esporas en ADS. **A.** Vial en buen estado. **B.** Vial con medio deshidratado. **C-E:** Cepa CCMFB-H660 *Cladosporium sphaerospermum* Penz. **C.** Fotomicrografía de la suspensión de esporas en ADS en el vial de la cepa conservada por tres años. **D.** Crecimiento en PDA de 7 días a 28 °C. **E.** Fotomicrografía de preparación en fresco a partir del microcultivo en PDA. Barras de escala: 10 µm.

**Fig. 1. A-B:** Eppendorf vials with spore suspension in ADS. **A.** Vial in good condition. **B.** Vial with dehydrated medium. **C-E:** Strain CCMFB-H660 *Cladosporium sphaerospermum* Penz. **C.** Photomicrograph of the spore suspension in ADS in the vial of the strain kept for three years. **D.** Growth in PDA of 7 days at 28 °C. **E.** Photomicrograph of fresh preparation from the microculture in PDA. Scale bars: 10 µm.

**TABLA I**

**Porcentajes de viabilidad (V) y pureza (P) de las cepas conservadas de *Cladosporium* de la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba**

\*: Fecha de conservación inicial de los grupos de cepas

**TABLE I**

**Percentages of viability (V) and purity (P) of the conserved strains of *Cladosporium* in the Culture Collection Microbial of the Biology Faculty, Havana University, Cuba**

\*: Initial conservation date of the strain groups

| No. Cepas conservadas | V y P (%) | Fechas de comprobación |            |              |            |              |               |            |            |            |              |            |
|-----------------------|-----------|------------------------|------------|--------------|------------|--------------|---------------|------------|------------|------------|--------------|------------|
|                       |           | enero 2016*            | abril 2016 | octubre 2016 | enero 2017 | octubre 2017 | octubre 2018* | enero 2019 | abril 2019 | junio 2019 | octubre 2019 | enero 2020 |
| 24                    | V         | 100                    | 100        | 100          | 100        | 100          | 91,6          | 95,8       | 100        | 100        | 100          | 100        |
|                       | P         | 100                    | 91,6       | 100          | 100        | 100          | 91,6          | 87,6       | 100        | 100        | 87,6         | 95,8       |
| 68                    | V         | -                      | -          | -            | -          | -            | 100           | 100        | 100        | 100        | 98,5         | 100        |
|                       | P         | -                      | -          | -            | -          | -            | 100           | 98,5       | 100        | 100        | 83,8         | 82,2       |
| Total = 92            | V         | 100                    | 100        | 100          | 100        | 100          | 97,8          | 98,9       | 100        | 100        | 98,9         | 100        |
|                       | P         | 100                    | 91,6       | 100          | 100        | 100          | 97,8          | 95,6       | 100        | 100        | 86,9         | 93,4       |

inóculo (Figura 1C). En este sentido, Ellis (1979) señaló que varias cepas fúngicas conservadas en agua destilada pueden formar colonias en el tubo por el arrastre de hifas y nutrientes durante la inoculación. No obstante, los bajos porcentajes de germinación de los conidios en el material conservado en el presente estudio evidencian la disminución de la actividad metabólica de las cepas, aun cuando varios autores consideran psicrófilas o psicrotolerantes a algunas especies del género *Cladosporium* (Singh & al. 2006, Sánchez & Almaguer 2018). Asimismo, la baja concentración de oxígeno en los tubos, escasez de nutrientes y estabilidad de la temperatura a 4 °C, fueron factores que determinaron los elevados porcentajes de viabilidad y pureza, así como el mantenimiento de la estabilidad morfológica.

En este proceso de conservación existen varios puntos críticos de control que podrían causar daños a la cepa conservada y como consecuencia ocasionar la pérdida de viabilidad o la contaminación. Primero, debe verificarse que la conservación inicial fue correcta, mediante una comprobación de viabilidad y pureza, al terminar el procedimiento de conservación. De esta forma se garantiza la calidad del material preservado. Se deben seguir reglas de asepsia y una adecuada manipulación del material para reducir el riesgo de contaminación y mantener la temperatura de refrigeración constante a 4 °C. La calidad del medio se debe monitorear sistemáticamente, al menos con una inspección visual, para evitar las pérdidas de viabilidad por deshidratación, detectar contaminaciones o crecimiento.

El espacio de almacenamiento disponible es otro factor a tener en cuenta, al ser empleadas en su mayoría como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica. La utilización de este método permite realizar varias réplicas y los viales requieren poco espacio. Esto lo hace idóneo para laboratorios de diferentes escalas o con procesamiento de un gran volumen de muestras. El medio agarizado, además de favorecer la inoculación, permite que se puedan realizar hasta 40 comprobaciones a partir del volumen inicial conservado. Por su parte el Tween 80, un surfactante totalmente inerte, facilita la disgregación de las esporas en suspensión y evita la formación de conglomerados y la inoculación directa desde el vial conservado (Thoman 1999).

## CONCLUSIONES

La conservación en ADS constituye un método alternativo para las cepas de *Cladosporium*, el que es sencillo y económico. Puede ser útil para colecciones docentes o lotes de los cuales se puedan tomar inóculos para estudios taxonómicos y fisiológicos. Además, facilita la recuperación del cultivo y garantiza elevados porcentajes de viabilidad y pureza.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

I. Pérez concibió la idea original, evaluó la factibilidad de la conservación de las cepas, analizó los datos y escribió la primera versión del manuscrito. K.C. Sánchez analizó los datos y tomó las fotos y fotomicrografías. T.I. Rojas revisó todas las versiones del artículo. M. Almaguer diseñó y supervisó la investigación, y gestionó los recursos de la investigación. Todos los autores contribuyeron en la discusión de los resultados y la revisión crítica del manuscrito.

## CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

**Aprobación de ética:** Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

**Consentimiento para la publicación:** Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almaguer, A., Sánchez, K.C. & Rojas, T.I. 2014. El género *Cladosporium* en la atmósfera del Occidente de Cuba: pasado, presente y futuro. *Revista Cub. Cienc. Biol.* 3(3): 8-17.

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.* 72: 1-401.

Bensch, K., Groenewald, J.Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Houbraken, J., Crous, P.W. & Samson, R.A. 2018. *Cladosporium* species in indoor environments. *Stud. Mycol.* 89: 177-301.

Capriles, C.H., Mata, S. & Middelveen, M. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 106: 73-79.

Ellis, J.J. 1979. Preserving fungus strains in sterile water. *Mycol.* 71(5): 1072-1075.

González, D.M.G. & Jiménez, J.N.Q. 2013. Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiol.* 4(1): 23-33.

Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105(12): 1422-1432.

Klich, M.A. & Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing. North Ryde, Australia.

Nakasone, K.K., Peterson, S.W. & Jong, S.C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. *Amsterdam, Nederland.*

Pitt, J.I. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65: 1135-1157.

Pitt, J.I. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing. North Ryde, Australia.

Riddel, G.S. 1950. Cutaneous diphtheria. *J. R. Army Med. Corps* 95: 65.

Rodríguez, B.D. & Gato, C.Y. 2010. Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad* 14 (4): 241-246.

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V. & Klaassen, C.H. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78:141-173.

Sánchez, K.C.E. & Almaguer, M. 2018. Efecto de la temperatura sobre aislados de *Cladosporium cladosporioides* recolectados del aire de La Habana, Cuba. *Nova Acta Ci. Compostelana, Biol.* 25: 21-29.

Singh, S.M., Puja, G. & Bhat, D.J. 2006. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Curr. Sci.* 90(10): 1388-1392.

Singh, K.S., Singh, P.N., Gaikwad, S.B. & Maurya, D.K. 2018. Conservation of Fungi: A Review on Conventional Approaches. Pp. 223-237.

En: Sharma, S. & Varma, A. (ed.). Microbial Resource Conservation. Soil Biology. Vol 54. Springer. Cham, Alemania. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_8)

Thoman, C.J. 1999. The versatility of polysorbate 80 (Tween 80) as an ionophore. *J. Pharm. Sci.* 88(2): 258-260.

Weng, Z., Díaz, O.E. & Álvarez, I. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cub. Hig. Epidemiol.* 43(3): 1-4.