



ARTÍCULO ORIGINAL

Colección de preparaciones permanentes de esporas de hongos aislados del aire

Collection of permanent slides of airborne fungi spores

Teresa I. Rojas Flores¹ , Michel Almaguer Chávez^{2*} , María Fernández-González³ 

RESUMEN

1 Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25, No 455, entre J e I. Vedado. La Habana. Cuba. trojas@fbio.uh.cu

2 Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25, No 455, entre J e I. Vedado. La Habana. Cuba. michel.almaguer@gmail.com

3 Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Campus Universitario As Lagoas, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, España.

mfgonzalez@uvigo.es

El objetivo de este trabajo fue obtener una colección de preparaciones permanentes de esporas fúngicas a partir de cepas de hongos del aire previamente caracterizados. Se siguió el método de montaje de preparaciones aerobiológicas recolectadas con el Lanzoni VPPS 2000. Se utilizó un fragmento de cinta Melinex con un fluido de silicona diluido en tetracloruro de carbono como superficie sobre la que se impregnan las esporas. Se lograron 191 preparaciones de 30 géneros. El 47% fueron géneros que pueden producir infecciones oportunistas, el 53% alergénicos, el 63% fitopatógenos y el 30% biodeteriorantes. Esta colección de preparaciones tiene utilidad práctica y permite el acceso a un grupo de preparaciones que pueden ser de referencia para la correcta y rápida identificación morfológica de esporas de hongos recolectadas del aire. Adicionalmente se puede utilizar en el entrenamiento de personal que se inicie en la identificación y recuento de las esporas fúngicas recolectadas por este método.

Palabras clave: aerobiología; micología ambiental; recuento de esporas

ABSTRACT

*Autor para correspondencia:

michel.almaguer@gmail.com

The aim of this work was to obtain a collection of permanent slides of fungal spores from previously characterized airborne fungal strains, using the method of mounting aerobiological preparations collected with the Lanzoni VPPS 2000. A piece of Melinex tape with a silicone fluid diluted in carbon tetrachloride was used as the surface on which the spores were impregnated. Among them, 47% belonged to genera capable of causing opportunistic infections, 53% were allergenic, 63% were phytopathogenic, and 30% contributed to biodeterioration. This collection has practical applications, providing access to a reference set for the accurate and rapid morphological identification of airborne fungal spores. Additionally, it serves as a valuable resource for training personnel who are beginning to identify and count fungal spores collected using this method.

Recibido: 2024-11-11

Aceptado: 2025-03-23

Keywords: aerobiology; environmental mycology; spore counting

INTRODUCCIÓN

La identificación de las esporas fúngicas recolectadas de la atmósfera por métodos no viables tiene impacto en varias ramas de la ciencia. La aeromicobiota puede ser alergénica o patógena (Denning *et al.*, 2014), biodeteriorante sobre diversos materiales (Borrego y Molina, 2014) o constituyen plagas de cultivos de interés económico (Fernández-González *et al.*, 2012). Es por ello que la caracterización de la diversidad fúngica de una región y la determinación de su variación espacio-temporal tienen impacto y aplicabilidad (Almaguer *et al.*, 2015). El reconocimiento e identificación taxonómica de las esporas fúngicas en las muestras aerobiológicas es imprescindible para determinar su dinámica y poder realizar el estudio integral de la atmósfera (Nitiu y Mallo, 2010).

Desde el 2010 en La Habana, Cuba, se realiza continuamente la recolección de esporas fúngicas del aire a través de un captador Lanzoni VPPS 2000, ubicado en la Facultad de Biología (Almaguer *et al.*, 2012). Este equipo recolector tipo HIRST se utiliza en la mayoría de las redes aerobiológicas del mundo (Frenguelli, 2013). Permite la succión continuada de aire, que impacta sobre una cinta de Melinex impregnada con un fluido de silicona y que avanza 2mm cada hora. De cada cinta semanal se obtienen ocho preparaciones en portaobjetos, en las que se utiliza glicerogelatina teñida con fucsina como líquido de montaje (Galán *et al.*, 2007). Cada preparación se observa en un microscopio óptico de campo claro, lo que permite identificar caracteres morfológicos distintivos en las esporas recolectadas y posteriormente clasificarlas en géneros o tipos esporales (Almaguer *et al.* 2015). Este análisis microscópico de las esporas y su identificación resulta difícil, debido al elevado número de esporas presente en las muestras; a la presencia de partículas de polvo, polen y restos de material vegetal; a la presencia de conglomerados de varias esporas fúngicas correspondientes a diferentes taxones; a la diversidad y la variedad de tamaño de los propágulos fúngicos; así como la experiencia micológica necesaria para diferenciar esporas de similar morfología. Adicionalmente, el propio sistema de recolección impide el cultivo del hongo, y por tanto el reconocimiento de otras estructuras, como las células o estructuras formadoras de esporas. El objetivo de este trabajo fue obtener una colección de

preparaciones permanentes de esporas fúngicas a partir de cepas de hongos del aire previamente caracterizados, utilizando el método de montaje de preparaciones aerobiológicas recolectadas con el Lanzoni VPPS 2000.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de la colección de preparaciones permanentes de hongos del aire se siguió la metodología de la Red Española de Aerobiología (Galán *et al.*, 2007), adaptada para lograr el objetivo del trabajo. La modificación consistió en que las preparaciones se hicieron a partir de hongos aislados de la atmósfera, y conservados *ex situ* en la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología. Cada cepa se inoculó en medio Agar Extracto de Malta, se incubó a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por una semana y a partir de esos cultivos se realizaron varias preparaciones.

Se utilizó un fragmento de cinta Melinex (entre 0,8-1,5 cm) con un fluido de silicona diluido en tetracloruro de carbono (LANZONI s.r.l. ®) como superficie sobre la que se impregnan las esporas (Galán *et al.*, 2007). La capa del fluido de silicona se extendió sobre la cinta con un pincel limpio. Esta acción se realizó con cuidado debido a que el tetracloruro de carbono es tóxico y volátil. El segmento de cinta con el adhesivo se presionó sobre el micelio aéreo del cultivo con la ayuda de una pinza limpia estéril. Se usó como medio de montaje glicerogelatina con fucsina (Galán *et al.*, 2007), que se depositó sobre el portaobjetos y sobre el fragmento de cinta con esporas que posteriormente se cubrió con un cubreobjetos (Figura 1 A-D).

En cada preparación se comprobaron las características morfológicas distintivas de las esporas recolectadas: color, forma, pared, tamaño, septación y algún otro carácter especial. Se utilizó un microscopio de campo claro Novel con cámara digital HDCE-10 acoplada para realizar las observaciones y se tomaron varias fotomicrografías con el software HDCE-10 Series CCD, 2010. Finalmente se rotularon y guardaron a temperatura ambiente, en contenedores limpios, secos y libres de polvo.

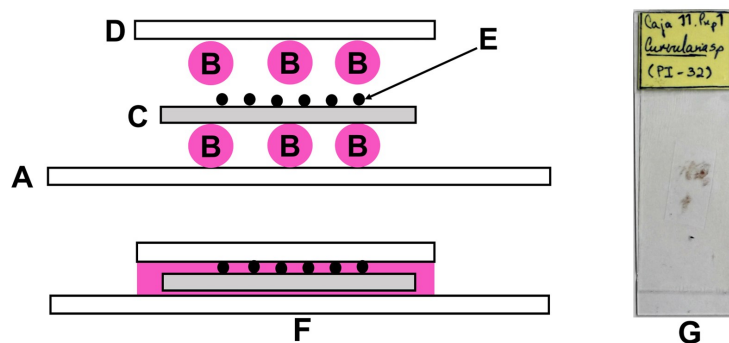


Figura 1: Esquema del procedimiento para realizar una preparación permanente. A: portaobjetos, B: glicerogelatina con fucsina, C: cinta de Melinex con fluido de silicona, D: cubreobjetos, E: esporas. F: Esquema de una preparación permanente, G: Fotografía de una preparación permanente.

Figure 1: Diagram of the procedure for making a permanent preparation. A: slide, B: glycerogelatin with fuchsin, C: Melinex tape with silicone fluid, D: coverslip, E: spores. F: Diagram of a permanent preparation, G: Photograph of a permanent preparation.

RESULTADOS Y DISCUSION

La metodología utilizada permitió obtener preparaciones en portaobjetos, donde las esporas se observan de igual manera que en las muestras aerobiológicas obtenidas con captadores tipo Hirst (Galán *et al.*, 2007; Rogers and Muilenberg, 2001). Según Galán *et al.*, (2007), el adhesivo utilizado (fluido de silicona diluido en tetracloruro de carbono), permanece inalterable en sus propiedades físicas entre los -20 y los 150°C , lo que la hace adecuada para todas las zonas bioclimáticas. Por su parte, la glicerogelatina es sólida a temperatura ambiente, por lo que es necesario licuarla para su utilización. Con este procedimiento se logra una preparación similar a la que se obtiene a partir de los muestreos con el equipo recolector Lanzoni VPPS 2000. La glicerogelatina con fucsina es soluble en agua; compatible con el fluido de silicona y permite almacenar las preparaciones por largo tiempo (Smith, 1990; Rogers and Muilenberg, 2001).

Se lograron 191 preparaciones de 30 géneros, en su mayoría hifomicetos. Todos se detectaron con anterioridad en varios de los estudios aerobiológicos de zonas occidentales de Cuba y las preparaciones se lograron de las cepas recolectadas por metodologías viables (Almaguer *et al.*, 2013; Almaguer y Rojas, 2013). El 47% de las preparaciones corresponde a géneros que pueden producir infecciones

oportunistas, el 53% se informan como alergénicos, el 63% pueden ser fitopatógenos y el 40% biodeteriorantes. El 13%, correspondiente a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia* y *Penicillium*, que se han asociado con las cuatro características. Estos géneros han resultado ser mayoritarios en la atmósfera de La Habana en estudios realizados entre los años 2010 y 2020, utilizando el captador Lanzoni VPPS 2000 como equipo recolector (Almaguer *et al.*, 2015; 2018; 2024; Diaz *et al.* 2024). Esta información es importante para la correcta identificación y recuento de esporas de determinados géneros seleccionados debido a su interés clínico, alergológico, fitopatogénico o biodeteriorante (Tabla 1).

Las preparaciones de los cuatro géneros mayoritarios se obtuvieron a partir de especies que se encuentran con elevada frecuencia en el aire de La Habana, estas fueron: *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. ustus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *Aspergillus sp.*, *A. tamarii*, *Penicillium sp.*, *P. glabrum*, *P. frequentans*, *P. funiculosum*, *P. waksmanii*, *P. corylophilum*, *P. citrinum*, *P. notatum*, *P. camemberti*, *P. aurantiogriseum*, *P. oxalicum*, *P. crustaceum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum*, *Cladosporium sp.*, *C. cladosporioides*, *C. trifolii* y *Curvularia sp.* La selección se basó en su detección y elevada frecuencia en el aire de La Habana.

Tabla 1: Géneros de los que se tienen preparaciones permanentes y su impacto.**Table 1:** Genera with permanent slides and their impact.

No	Género	Cantidad	Impacto
1	<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Haller	45	IO,A,F,B
2	<i>Absidia</i> Tiegh.	2	IO
3	<i>Acremonium</i> Link	2	IO,B
4	<i>Alternaria</i> Nees	12	IO,A,F,B
5	<i>Bipolaris</i> Shoemaker	5	A,F,B
6	<i>Botrytis</i> P. Micheli. Ex Haller	3	F
7	<i>Chaetomium</i> Kunze	3	A,F,B
8	<i>Chrysonilia</i> Arx	3	A
9	<i>Cunninghamella</i> Matr.	3	A
10	<i>Cladosporium</i> Link	23	IO,A,F,B
11	<i>Colletotrichum</i> Corda	2	F,B
12	<i>Curvularia</i> Boedijn	8	IO,A,F,B
13	<i>Eurotium</i> Link	2	IO,A,B
14	<i>Fusarium</i> Link	3	IO,F,B
15	<i>Geotrichum</i> Link	2	IO
16	<i>Glomerella</i> Spauld. & H. Schrenk.	2	A,F
17	<i>Memmoniella</i> Höhm.	3	A
16	<i>Nigrospora</i> Zimm.	3	A,F,B
19	<i>Nodulisporium</i> Preuss	2	F
20	<i>Paecilomyces</i> Bainier	2	IO,F
21	<i>Penicillium</i> Link	35	IO,A,F,B
22	<i>Periconia</i> Tode	2	A
23	<i>Pestalotiopsis</i>	2	F
24	<i>Phoma</i> Fr. Steyaert	2	F
25	<i>Pyricularia</i> (Sacc.) Sacc.	2	F
26	<i>Rhizopus</i> Ehrenb.	8	IO,F,B
27	<i>Scopulariopsis</i> Bainier	3	IO,A
28	<i>Spegazzinia</i> Sacc.	2	A
29	<i>Syncephalastrum</i> J. Schröt.	3	IO
30	<i>Trichoderma</i> Pers.	2	F,B

Leyenda: **IO**-Infecciones oportunistas (Bonifaz, 2012); **A**-Alergénicos (Kocharet *et al.*, 2014); **F**-Fitopatógenos (Agrios, 2005; Fei and Lui, 2023; Laneet *et al.* 2023); **B**-Biodeteriorantes (Borrego *et al.*, 2012; Borrego *et al.*, 2017; Borrego and Molina, 2020; Borrego, 2021; Torres *et al.*, 2022)

En los muestreos aerobiológicos donde se utilizan captadores volumétricos no viables, como el Lanzoni VPPS 2000, el reconocimiento de las esporas se realiza mediante la observación al microscopio óptico (Smith, 1990; Mandrioli y Ariatti, 2001; Galán *et al.*, 2007). Estas biopartículas, en su gran mayoría están desvinculadas del resto de las estructuras que las originaron, lo cual puede dificultar su identificación. Algunas pueden tener malformaciones, pérdida de parte de su estructura, o modificaciones en el proceso de captura, lo cual puede dificultar su identificación (Oteros *et al.*, 2013; Rua, 2013). Por otra parte, a pesar de que la metodología utilizada posee reconocidas ventajas para la realización de muestreos aerobiológicos continuos, presenta el inconveniente de que no permite el cultivo *in vitro* de las esporas para el estudio de la ontogenia y su precisa identificación taxonómica. Por esta razón, el reconocimiento constituye un problema crucial en el proceso de recuento de las muestras. Otro aspecto importante que obstaculiza el reconocimiento se relaciona con la imposibilidad de discriminar, en algunos casos, entre esporas sexuales y asexuales, ya que muchos de los propágulos fúngicos con apariencia similar en la observación microscópica frecuentemente pertenecen a distintas fases de un mismo ciclo.

Esta colección de preparaciones se conserva en el Laboratorio de Micología Ambiental de la Facultad de Biología y complementa la información sobre la biodiversidad atmosférica habanera. En cada preparación permanente se encuentran esporas de un solo género, lo que favorece la observación de sus caracteres morfológicos (Figura A). En contraste, en las preparaciones que se obtienen a partir del equipo recolector se detecta polvo o fragmentos de otras partículas atmosféricas (Figura 2 B).

Esta colección de preparaciones tiene utilidad práctica ya que la metodología que actualmente se usa en La Habana, basada en el captador Lanzoni VPPS 2000, puede ser aplicada en otras regiones del país. En este sentido, los análisis de diversidad en cada región son el primer paso para la caracterización aeromicológica (Almaguer *et al.* 2013; 2015). También permite el acceso a un grupo de preparaciones que pueden ser de referencia para la correcta y



Figura 2: Fotomicrografía de esporas de *Curvularia* sp. **A:** preparación a partir de un cultivo, **B:** preparación a partir de una muestra aerobiológica recogida con el Lanzoni VPPS 2000. ___ Barra de escala 10µm.

Figure 2: Photomicrograph of *Curvularia* spores. **A:** preparation from a culture, **B:** preparation from an aerobiological sample collected with the Lanzoni VPPS 2000. ___ Scale bar 10µm.

rápida identificación de esporas de hongos del aire. Adicionalmente se puede utilizar en el entrenamiento de personal que se inicie en la identificación y recuento de las esporas fúngicas recolectadas por este método.

AGRADECIMIENTOS

A María Jesús Aira Rodríguez (Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia, USC, España) y Angélica M. Estrada Pacheco, por toda la ayuda aportada para lograr esta colección. Al proyecto institucional de la Universidad de La Habana. NAP223LH001-058 Caracterización aerobiológica sistemática de la atmósfera de La Habana.

LITERATURA CITADA

- Almaguer, M., Díaz, L., Fernández-González, M., & Salas, S. (2021). Assessment of airborne *Curvularia* propagules in the atmosphere of Havana, Cuba. *Aerobiologia*, 37(1), 53-69.
- Almaguer, M., Aira, M. J., Rojas, T. I., Fernández-González, M., & Rodríguez-Rajo, F. J. (2018). New findings of airborne fungal spores in the atmosphere of Havana, Cuba, using aerobiological non-viable methodology. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(2), 349-359.
- Almaguer, M., M.J Aira, F.J. Rodríguez-Rajo, M. Fernández-González y T.I Rojas (2015). Thirty-four identifiable airborne

- fungal spores at Havana, Cuba. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22 (2): 215–220
- Bonifaz, A (2012) *Micología Médica Básica*. México. Editorial Interamericana McGraw-Hill
- Borrego, S. y A. Molina (2014) Comportamiento de la aeromicrobiota en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba durante 7 años de estudio. *AUGMDOMUS*. 6:1-24
- Borrego, S., P. Lavin, I. Perdomo, S. Gómez de Saravia y P. Guimet (2012) Determination of indoor air quality in archives and biodeterioration of the documentary heritage. *International Scholarly Research Network Microbiology*. 1-10. <https://doi.org/10.5402/2012/826786>.
- Borrego, S. & Molina, A. (2020). Behavior of the cultivable airborne mycobiota in air-conditioned environments of three Havanan archives, Cuba. *Journal of Atmospheric Science Research*. 3(1): 16-28.
- Borrego S. (2021). Análisis ecológico de la micobiota existente en el ambiente interior de la mapoteca del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Boletín del Archivo Nacional*, 25(1): 42-54.
- Borrego, S., Molina, A. & Santana, A. (2017). Fungi in archive repositories environments and the deterioration of the graphics documents. *EC Microbiology*, 11(5): 205-226.
- Torres A.E., Borrego S., Calero V., Castro M. (2022). Evaluación preliminar de la calidad del aire en locales de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 53(1): 087-105.
- Denning, D. W., C.Pashley, D. Hartl, A. Wardlaw, C. Godet, S. Del Giacco y S. Sergejeva (2014) Fungal allergy in asthma—state of the art and research needs. *Clinical and Translational Allergy*. 4 (1): 14-24
- Díaz Vázquez, L., Almaguer Chávez, M., Fernández-González, M., & Sánchez Espinosa, K. C. (2024). New airborne fungal spores in the atmosphere of Havana, Cuba. *Aerobiología*, 1-11.
- Fei, W., Liu, Y. (2023) Biotrophic Fungal Pathogens: a Critical Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 195, 1–16 <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04087-0>.
- Fernández-González, M., F.J. Rodríguez-Rajo, V. Jato, M.J. Aira, H. Ribeiro, M. Oliveira e I. Abreu (2012) Forecasting ARIMA models for atmospheric vineyard pathogens in Galicia and Northern Portugal: *Botrytis cinerea* spores. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19(2): 255-262
- Galán, C., P. Cariñanos, P. Alcázar y E. Domínguez (2007) *Manual de Calidad y Gestión de la Red Española de Aerobiología*. Córdoba, Spain: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 61pp
- Kochar, S., M.Ahlawat, P. Dahiya y D. Chaudhary (2014) Assessment of allergenicity to fungal allergens of Rohtak city, Haryana, India. *Allergy & Rhinology*. 5(2), 52-56
- Lane, C. R., Beales, P. A., & Hughes, K. J. (Eds.). (2023). *Fungal Plant Pathogens: Applied Techniques*. CABI.
- Mandrioli, P., & Ariatti, A. (2001). Aerobiology: future course of action. *Aerobiología*, 17(1), 1-10.
- Nitiu, D. S., A.C. Mallo, M.C. Gardella-Sambeth y M.A. Morbelli (2010) Contribución a la identificación de esporas del reino Fungi en la atmósfera de la Plata, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 45: 301–308
- Oteros, J., Galán, C., Alcázar, P., & Domínguez-Vilches, E. (2013). Quality control in bio-monitoring networks, Spanish Aerobiology Network. *Science of the Total Environment*, 443, 559-565.
- Rogers, Ch. y Muilenberg, M. (2001). *Comprehensive guidelines for the operation of Hirst-type suction bioaerosol samplers. Standardized Protocols*. Pan-American Aerobiology Association. The Pan American Aerobiology Association. USA. 11pp
- Rúa Giraldo, A. L. (2013). *Aerobiología de las Esporas de Pleosporales en Ambientes intra y Extradomiciliarios de Barcelona: Aplicación a la Clínica en Población Alérgica*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Smith, E.G., 1990. *Sampling and Identifying Allergenic Pollens and Molds*. Blewstone Press, San Antonio.