



COMUNICACIÓN BREVE

Caracterización de *Cephalotrichum gorgonifer* aislado de la atmósfera de La Habana

Characterization of Cephalotrichum gorgonifer isolated from the atmosphere of Havana

Teresa I. Rojas Flores y Michel Almaguer*

Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

* Autor para correspondencia:
michelalm@fbio.uh.cu

RESUMEN

Se caracterizó un aislado de la especie *Cephalotrichum gorgonifer*, recolectado de la atmósfera de La Habana. Esta especie se registra por primera vez en la atmósfera de Cuba, lo que contribuye al conocimiento de la diversidad de la aeromicobiota.

Palabras clave: aeromicobiota, nuevo registro, hongo sinematoso.

ABSTRACT

One isolate of the species Cephalotrichum gorgonifer, isolated from the atmosphere of Havana is characterized. This species is recorded for the first time in the atmosphere of Cuba, which contributes to knowledge of airborne fungi diversity.

Keywords: airborne fungi, new record, synnematous fungus

INTRODUCCIÓN

Los estudios de la aeromicobiota viable de La Habana informan la presencia de hongos de diversos grupos, dentro de los cuales predominan los hifomicetos. Los trabajos de Arnold y Guerra (1989) y Castañeda *et al.* (1996), evidenciaron una elevada diversidad en el aire de una zona periférica, con el uso de placas expuestas con medio de cultivo. Los posteriores estudios de Rojas *et al.* (2007) y Almaguer y Rojas (2013) se basaron en métodos volumétricos que, además de aportar datos sobre la diversidad fúngica, también permitieron determinar las concentraciones de propágulos en el aire.

Estas investigaciones sistemáticas en la atmósfera capitalina, han permitido la detección sistemática de hongos predominantes como *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Almaguer y Rojas, 2013), así como el registro esporádico de otros hongos menos frecuentes en el aire (Almaguer *et al.*, 2016, 2018). El incremento en el número de especies detectadas en la atmósfera de una misma región es una de las características que enfatiza el carácter

Recibido: 2018-01-14

Aceptado: 2018-08-29

dinámico de este medio. Este comportamiento puede deberse a diversas causas, entre las que se encuentran la compleja relación con las condiciones climáticas, los cambios en los patrones de esporulación de los hongos, el lugar donde se producen y liberan las esporas, sus trayectorias de transporte en la atmósfera o la actividad antrópica.

El objetivo de esta comunicación breve es caracterizar un aislado de una especie detectada por primera vez en la atmósfera de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado fúngico (HVM-128) se recolectó de la atmósfera en medio agar extracto de malta, con un biocolector volumétrico (Aeroscopio Chirana), en la azotea de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Se siguió la metodología de muestreo planteada por Almaguer y Rojas (2013) y posteriormente se realizó el aislamiento. La identificación taxonómica del aislado se basó en los criterios planteados por Sandoval-Denis *et al.* (2016). Se inoculó en medio agar papa dextrosa (PDA del inglés *Potato dextrose agar*) y se incubó a 28°C durante 14 días, para observar la formación de sinemas. Posteriormente se hicieron preparaciones en fresco con lactofenol. Se realizaron 50 mediciones del largo y ancho de los conidios, así como de los sinemas. El estudio morfo-métrico se realizó en un microscopio óptico de campo claro y se tomaron fotomicrografías con una cámara HDCE-20(CCD) y el software IMI Video Capture.exe.

Los resultados de las dimensiones se resumieron como un rango de mediciones con los valores promedios entre corchetes.

Se determinó el crecimiento a 28°C y 37°C, de un cultivo monospórico en PDA. Se midió el diámetro de cada colonia (mm) a los 7 días y se calculó el promedio de tres réplicas. Se comprobó la germinación a partir de suspensiones de esporas que se incubaron a 28°C y 37°C durante 24 horas. Se contaron en cámara de Neubauer hasta 200 esporas (ET) y de ellas se registró el número de las que germinaron (EG). Se consideró como espora germinada únicamente a las que presentaron un tubo germinativo igual o superior al doble de su diámetro. Con estos datos se calculó el porcentaje de germinación ($EG/ET \cdot 100$). Para detectar diferencias significativas entre los valores de crecimiento y germinación a las temperaturas evaluadas, se realizó la prueba t Student del programa SATISTICA versión 6.0 (STATSOFT, INC., 2001).

El aislado se inoculó en placas Petri con agar Czapek suplementado con 5 % de sangre de carnero desfibrada para evaluar cualitativamente la producción de hemolisinas (Bogomolova y Kirtsideli, 2009). Se determinó la actividad proteasa con albúmina de suero bovino y la actividad fosfolipasa en medio con yema de huevo (Fotedar y Al-Hedaithy, 2005). En todos los casos se midió el diámetro de la colonia (Dc) y el halo de hidrólisis (Dh) y se calculó el índice de actividad enzimática (Ae) con la siguiente fórmula: $Ae = Dc/Dh$ (Ping *et al.*, 2011). Todas estas pruebas fisiológicas se revisaron a los 7 días de incubación, se realizaron por triplicado y con controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislado HVM-218 se identificó como la especie *Cephalotrichum gorgonifer* (Bainier) Sandoval-Denis, Gené & Guarro. Se detectó el 27 de octubre de 2016 y representó un 5 % de todos los hongos filamentosos detectados en ese día de muestreo. El momento de su recolecta del aire se caracterizó por una temperatura de 26,3°C, humedad relativa de 67% y viento de dirección Este, de 10-24km/h.

En los cultivos en PDA el aislado formó sinemas mayores de hasta 1 000 μm de altura con estipes de color marrón oscuro a negro y presencia de setas torcidas en espiral (Fig. 1 A-C). Además, se observaron conidios formados en anélides, lisos, con la forma y las dimensiones distintivas de la especie (Fig. 1 A-C y Tabla 1).

Sandoval-Denis *et al.*, (2016) plantearon que *C. gorgonifer* es morfológicamente similar a otras especies del género, como *C. cylindricus* y *C. dendrocephalus*, pero es fácilmente reconocible por sus setas enrolladas en espiral. Las cepas sin setas o con setas mal desarrolladas se pudiera confundir con *C. purpureofuscum*, sin embargo los conidios de esta especie son marrones y con ápices ligeramente puntiagudos, mientras que los de *C. gorgonifer* son de color gris pardo y con ápices redondeados.

Estas diferencias fenotípicas entre las especies planteadas en el estudio anteriormente mencionado, se corroboraron con los resultados del análisis filogenético molecular usando secuencias de ADN para cuatro loci (las regiones ITS del ADN ribosomal, fragmentos de del ADN ribosómico, el factor de elongación de la traducción 1α y β -tubulina).

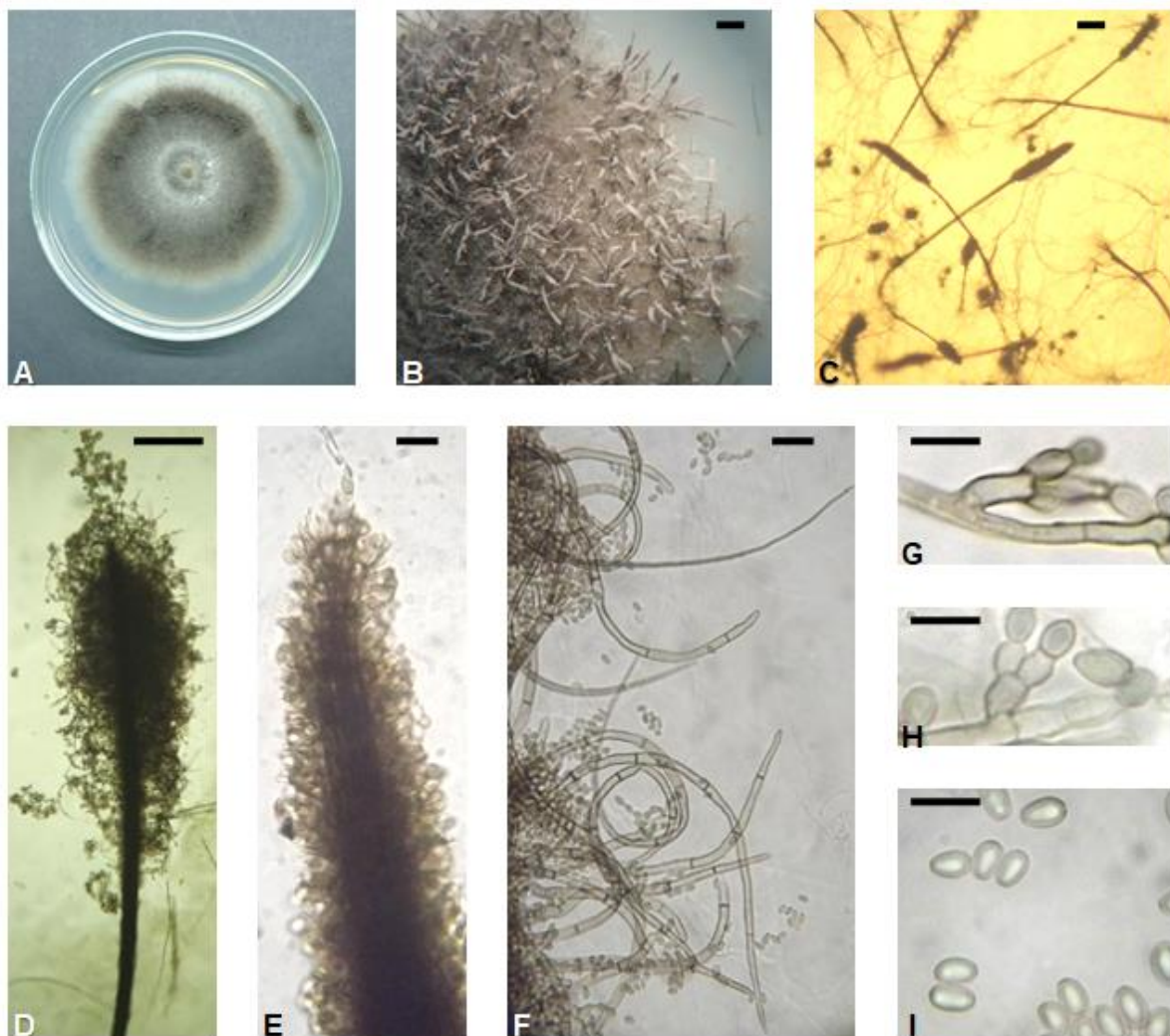


Figura 1. *Cephalotrichum gorgonifer* (HVM-128). A. Colonia en PDA, 14 días de incubación a 28 °C. B-D. Sinemas. F. Detalle de setas del sinema. G-H. Células conidiógenas. I. Conidios. Barras de escala: B - D = 200 µm, E - I = 10 µm.

Figure 1. *Cephalotrichum gorgonifer* (HVM-128). A. Colonies on PDA after 14 days at 28 °C. B-D. Synnemata. F. Detail of synnemal seta. G-H. Conidiogenous cells. I. Conidia. Scale bars: B-D = 200 µm; E-I = 10 µm.

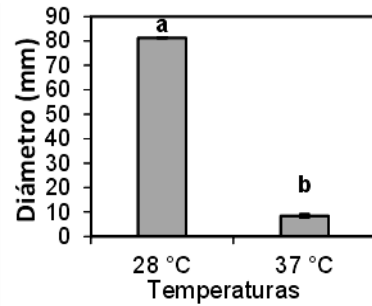
Tabla 1. Características morfológicas distintivas de *Cephalotrichum gorgonifer* observadas en el aislado HVM-218
Table 1. Distinctive morphological features of *Cephalotrichum gorgonifer* observed in the isolate HVM-128

Sinemas Tamaño (µm)	Conidios				
	Tamaño (µm)	Forma	Ápices	Superficie	Color
500 - 1000 [780]	4 - 8 × 2,5 - 4 [6,7 x 3]	Oval - elipsoidal	redondeados	lisa	gris pardo claro

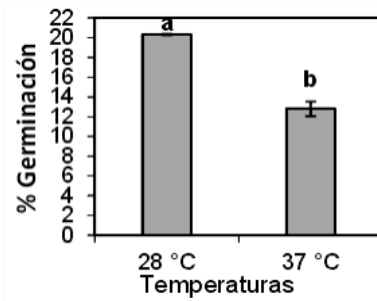
La especie *C. gorgonifer* se reconocía anteriormente como *Trichurus spiralis* y se ha informado comúnmente en el suelo y material vegetal en descomposición (Sandoval-Denis *et al.*, 2016). En Cuba se ha detectado fundamentalmente en sustratos vegetales. Se ha registrado en localidades de La Habana y Sancti Spíritus asociada a hojas de *Saccharum officinarum* L., hojas de *Theobroma cacao* L., así como en hojas y semillas de *Vigna unguiculata* L. Walp. (Mena *et al.* 1995; Camino *et al.*, 2006). Adicionalmente, Arnold (1986) y Camino *et al.* (2006) encontraron a *Cephalotrichum* sp. asociado a hojas de *Citrus aurantium* L.

La revisión taxonómica de *Microascaceae* con énfasis en los hongos sinematosos, realizada por Woudenberg *et al.* (2017), permitió la caracterización de varias cepas ambientales de *Cephalotrichum*. En el estudio anteriormente mencionado se relacionó a *C. gorgonifer* como la especie más común de este género en ambientes interiores, especialmente en los edificios en construcción. A pesar de ello, en Cuba no existen referencias de su aislamiento a partir del aire. En el momento de su detección el edificio de la Facultad de Biología (sitio de muestreo) se encontraba en mantenimiento constructivo, al igual que varias edificaciones en los alrededores, lo que pudo influir en su presencia en el aire.

El aislado creció a 28 °C y 37 °C, con la formación de sinemas y la germinación de conidios en las dos temperaturas (Fig. 2). En este sentido Sandoval-Denis *et al.* (2016) analizaron varias cepas de esta especie, procedentes de muestras clínicas humanas (cabello y fluidos de lavados broncoalveolares o senos maxilares) e informaron que crecían en un rango amplio de temperaturas (5 – 37 °C). Aunque los autores anteriormente mencionados trabajaron con muestras clínicas e informaron que *C. gorgonifer* puede crecer a la temperatura fisiológica del humano, también plantearon que el potencial patogénico de esta especie es incierto, ya que no hay suficientes datos médicos disponibles. Asimismo refirieron que el origen de los aislados y el método común de dispersión en el aire de estos hongos, hace posible que sean contaminantes de muestras hospitalarias. En este sentido la *American Type Culture Collection* (ATCC) refiere a esta especie como un nivel de bioseguridad 1 (ATCC® 12249™).



A



B

Figura 2. Crecimiento (A) y porcentajes de germinación de conidios (B) de *C. gorgonifer* a 28 °C y 37 °C. Letras no comunes indican diferencias significativas para $p < 0,05$, según la prueba de t Student. $I = Sx$, $n = 3$.

Figure 2. Growth (A) and percentages of conidia germination (B) of *C. gorgonifer* at 28 °C and 37 °C. Uncommon letters indicate significant differences for $p < 0.05$, according to the t Student test. $I = Sx$, $n = 3$.

En la Tabla 2 se aprecia que, según la clasificación de Ping *et al.* (2011), esta cepa tiene débil actividad hemolítica (Ae 0,89 - 0,80), así como muy débil actividad proteolítica y fosfolipasa (Ae 0,99 - 0,90). Lo que evidencia una débil actividad de exoenzimas que se han relacionado con factores de virulencia. Las proteasas pueden degradar varias moléculas en los hospedantes y las fosfolipasas están directamente relacionadas con la desestabilización de membranas (Ma y May, 2009).

Tabla 2. Hemólisis, actividad proteolítica y actividad fosfolipasa del aislado HVM-128

Table 2. Haemolysis, proteolysis and phospholipase activity tests of the isolate HVM-128

Actividad	Ae	Clasificación (Ping <i>et al.</i> , 2011)
Hemolítica	0,78	Débil
Proteolítica	0,98	Muy débil
Fosfolipasa	0,99	Muy débil

Una cantidad considerable de hongos están adaptados a un hábitat ambiental no humano pero tienen la capacidad de causar micosis cuando se establecen casualmente en el humano (Sterflinger *et al.*, 1999). Estos hongos aparentemente poseen características fisiológicas que les permiten sobrevivir en los tejidos del hospedante, y desarrollarse en condiciones ambientales desfavorables. Un caso de estas condiciones adversas pueden ser las temperaturas elevadas. Estas características se denominan factores de vitalidad, son inespecíficos y no están especialmente diseñados para el crecimiento en tejido animal (de Hoog *et al.*, 2000). Solo se constató la germinación de esporas y el crecimiento a 37°C, y actividades exoenzimáticas muy débiles, como características para la adaptación al humano como hospedante. Ello puede indicar la inocuidad de esta cepa. Aunque de Hoog *et al.* (2000) plantearon que aparentemente, los factores de vitalidad por sí solos son insuficientes para causar una micosis.

La cepa caracterizada se depositó en la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología (*C. gorgonifer* CCMFB - 595) en dos métodos de conservación, agua destilada y tubos con PDA recubiertos con aceite mineral (Abd-Elsalam *et al.* 2010). Ello permitirá su utilización con fines docentes o investigativos, teniendo en cuenta su débil potencialidad como patógeno oportunista. Sandoval-Denis *et al.* (2016) en su amplio estudio sobre hongos sinematosos de la familia *Microascaceae*, plantearon que la conservación *ex situ* es crucial para el desarrollo de investigaciones taxonómicas. En dicho trabajo, varios taxones no pudieron ser estudiados debido a la falta de cultivos depositados en colecciones y por consiguiente considerados especies inciertas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Marilyn Marzo Mena y al Proyecto Nacional P211LH007-017 "Caracterización aeromicrobiológica de la atmósfera de La Habana: su impacto en la salud y la agricultura".

LITERATURA CITADA

Abd-Elsalam, K., M. Yassin, M. Moslem, A., Bahkali, *et al.* (2015) Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. *Fungal Diversity* 45(1): 21-32

- Almaguer, M. y T. Rojas (2013) Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. *NACC. Biología* 20: 35-45
- Almaguer, M., M. J. Aira, T. Rojas, M. Fernández-González y Rodríguez-Rajo F. J. (2018) New findings of airborne fungal spores in the atmosphere of Havana, Cuba, using aerobiological non-viable methodology. *Ann. Agric. Environ. Med.* doi: 10.26444/aaem/89738
- Arnold, G. R. W. (1986) Lista de Hongos Fitopatógenos de Cuba. Editorial Científico-Técnica. La Habana. 207 pp.
- Arnold, G. R. W., A. G. Guerra y N. Rodríguez de la Rosa (1987) Presencia de hongos del aire del INIFAT. *Reporte de Investigación del INIFAT* 43:1-6
- ATCC® 12249™. *Cephalotrichum gorgonifer* (Bainier) Sandoval-Denis *et al.* Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/12249.aspx#generalinformation>. Último acceso: 26 de junio de 2018
- Bogomolova, E. V. e I. Kirtsideli (2009) Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63: 156-160
- Camino, M., J. Mena y D. W. Minter (2006) Fungi of Cuba. Disponible en: www.cybertruffle.org.uk/cubafung. Última consulta: 20 de junio de 2018
- Castañeda, R. F., D. E. Fabrè, M. P. Parra, M. Perez, *et al.* (1996) Some airborne conidial fungi from Cuba. *Mycotaxon* 60: 283-290.
- de Hoog G. S., J. Guarro, J. Gene y M. J. Figueras (2000) Atlas of clinical fungi. 2da Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. CBS. Utrecht, Netherlands. 1226pp.
- Fotedar, R. y S. S. A. Al-Hedaithy (2005) Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 48: 62-67
- Ma, H. y R. C. May (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv. Appl. Microbiol.* 67: 131-190
- Mena, J., M. O. López, A. Mercado, A. Hernández *et al.* (1995) Adiciones a la micobiota de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrida) en Cuba. I. Hifomicetos. *Rev. Iberoam. Micol.* 12 (2): 31-35
- Ping, G., G. Xia-Lu, Y. Nian-Shen y W. D. Liu (2011) *In vitro* evaluation of phospholipase, proteinase and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia* 172: 429-438
- Rojas, T. I., N. Llanes, M. Benitez, M. J. Aira, *et al.* (2007) El género *Aspergillus* en la atmósfera de La Habana (Cuba). *Bol. Micol.* 22: 41-46
- Sandoval-Denis, M., J. Guarro, J. F. Cano-Lira, D. A. Sutton *et al.* (2016) Phylogeny and taxonomic revision of *Microascaceae* with emphasis on synnematosous fungi. *Stud. Mycol.* 83: 193-233
- STATSOFT, INC. (2001) Statistica (Data Analysis Software System), Version 6. <http://www.statsoft.com>
- Sterflinger, K., G. S. de Hoog y G. Haase (1999) Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Stud. Mycol.* 43: 5-22
- Woudenberg, J. H. C., M. Sandoval-Denis, J. Houbraken, K. Seifert *et al.* (2017) *Cephalotrichum* and related synnematosous fungi with notes on species from the built environment. *Stud. Mycol.* 88: 137-159



Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández-Rodríguez