

Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos

Rico, M.; Piattoni, C. V.; Gonzalez, C.; Monela, R.; Latorre, M. G.; Lurá, M.C.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina.

RESUMEN: Una de las tareas más importantes de los laboratorios de microbiología es la conservación y manutención de colecciones de microorganismos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de algunos hongos filamentosos conservados por diferentes métodos. Para ello, se procedió a la reactivación de las cepas mantenidas, durante distintos periodos de tiempo, mediante liofilizado, congelado a -80°C , Sordelli «modificado» y bajo capa de vaselina estéril. El 100% de las cepas conservadas por liofilizado se reactivaron satisfactoriamente; el 90% y el 93,9% de los mantenidos por congelado y Sordelli «modificado», respectivamente, resultaron viables; mientras que sólo el 14% de los conservados por supresión de la evaporación no pudieron recuperarse. Todos los hongos que desarrollaron conservaron sus características morfológicas originales y no se observaron contaminaciones con otros microorganismos ni con ácaros. De los resultados obtenidos se concluye que los métodos empleados permiten una buena recuperación de los cultivos fúngicos conservados.

Palabras claves: Conservación de hongos filamentosos, Colección de cultivos fúngicos.

SUMMARY: Viability of fungus strains preserved using different methods. Rico, M.; Piattoni, C. V.; Gonzalez, C.; Monela, R.; Latorre, M. G.; Lurá, M.C. A key task in microbiological laboratories involves preservation and maintenance of collections of microorganisms. The aim of this work was to assess the viability of some filamentous fungi subjected to different preservation methods. Therefore, strains kept during different periods of time under sterile vaseline or using lyophilization, freezing (-80°C) and modified Sordelli were reactivated.

All the lyophilized strains were successfully reactivated; 90% and 90.3% of those frozen or subjected to modified Sordelli resulted to be viable, while only 14% of those preserved through suppression of evaporation could not be recovered. All grown fungi preserved their original morphological characteristics and no contamination with other microorganisms or mites could be detected. The results obtained suggest that the preservation methods used allow a satisfactory recovery of fungus cultures.

Key words: preservation of filamentous fungi, collection of fungus cultures.

* Correspondencia

Bqca. Marina Rico - Gobernador Candiotti 1856
(3000) Santa Fe, Argentina.
e-mail: mrico@fbc.unl.edu.ar

Introducción

Una de las tareas más importantes de los laboratorios de microbiología es la mantención y conservación de colecciones de microorganismos, a fin de mantener, a lo largo del tiempo, todas las cepas viables, sin cambios en sus genotipos y disponibles para las aplicaciones en que se las necesite.

Los procedimientos existentes son numerosos y variados; su utilidad dependerá de que permitan la supervivencia de, al menos, el 70-80% de las células y de que estas, a su vez, permanezcan sin sufrir mutaciones o algún tipo de proceso de recombinación genética. (1,2)

Cuando se va a seleccionar el método a aplicar, deben tenerse presente distintos factores. Entre ellos se destacan el tiempo que se desea mantener conservados los cultivos (períodos de tiempo cortos o largos), las características de los microorganismos a conservar y las facilidades disponibles en el laboratorio.

Las técnicas de conservación se pueden agrupar en: a) Métodos de conservación a largo plazo o de elección, b) Métodos alternativos y c) Métodos restringidos. (3)

Entre los del primer grupo, los más utilizados son los métodos de secado y la congelación. Permiten detener el crecimiento de las células, sin producir su muerte; de esa manera, al evitarse la aparición de generaciones sucesivas, se garantiza la estabilidad genética, lo que los transforma en los métodos más recomendables. Se emplean fundamentalmente cuando se desea mantener las cepas por períodos de tiempo muy prolongados. (1,3)

Los métodos de secado se basan en la eliminación de la mayor cantidad de agua presente en el medio en el que se colocan los microorganismos. Las células que sobreviven al proceso detienen su metabolismo, quedando en estado de latencia. (3)

La liofilización es uno de estos métodos. Consiste en someter a sublimación la solución congelada donde se encuentran las células a conservar. Para evitar que las células sufran algún tipo de daño, se requiere el agregado de un agente crioprotector. Una vez liofilizadas se almacenan a temperatura ambiente, por lo que este método es muy conveniente por su comodidad para guardar y/o enviar cepas. (1,3)

Sordelli "modificado" es otro de los métodos de secado. Ideado por investigadores pertenecientes a la Universidad Nacional del Litoral (datos no publicados)¹. Se trata de un procedimiento que combina el liofilizado con la técnica original propuesta por Sordelli (4); es algo más complejo y laborioso que el liofilizado, pero no requiere el uso de un liofilizador, siendo suficiente trabajar con una bomba de vacío.

La congelación consiste en guardar una suspensión de las células a una temperatura por debajo de 0°C. En estas condiciones su crecimiento se detiene ya que no disponen de agua líquida. Los fenómenos fisicoquímicos que se producen durante la congelación pueden afectar la viabilidad celular, por lo que resulta imprescindible trabajar con un agente crioprotector. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores: glicerol, dimetilsulfóxido (DSMO), leche descremada e hidratos de carbono (glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc.). La elección del mismo va a depender del tipo de microorganismo a conservar. (1,5)

A los métodos alternativos, se recurre cuando no se puede utilizar alguno de los anteriores. Algunos de los métodos que integran este grupo son: la supresión de la evaporación, la transferencia periódica, la suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril, etc. Debido a que no aseguran la conservación del genotipo, nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar la cepa utilizando, simultáneamente, al menos dos técnicas. (3)

La conservación bajo aceite mineral estéril es un método de supresión de la evaporación. Consiste en cubrir con aceite mineral estéril o vaselina estéril (peso específico: 0,830-0,890) una estría del hongo a conservar (hasta 10 mm sobre su superficie), impidiendo la evaporación del agua contenida en el medio de cultivo y evitando el incremento de presión osmótica, por concentración de los solutos, que produciría alteraciones importantes en el cultivo. Es un método sencillo, económico y rápido. Los conservados pueden mantenerse a temperatura ambiente o refrigerados. (4,6)

Los métodos restringidos no se utilizan habitualmente. Los más comunes son: Desecación en papel de filtro y la Desecación en tierra, arena o

1- Emiliani E.; Flamini A. Comunicación personal. Dpto. de Biotecnología. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. 1964

silicagel o algún otro soporte apropiado. Detienen el crecimiento de las células por eliminación del agua disponible. Se aplican a aquellos grupos de microorganismos que no resisten los métodos de elección. (3)

En el caso particular de los hongos filamentosos, pueden utilizarse distintos métodos de conservación, según el tipo y grado de esporulación que presenten sus especies.

Desde hace muchos años, la cátedra de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, cuenta con una colección de hongos, efectuándose el mantenimiento de la misma mediante diferentes técnicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de algunas de las cepas que la integran.

Materiales y métodos

Cepas fúngicas

Se trabajó con algunos de los hongos filamentosos (especies de *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, otros Hyphomycetes, *Coelomycetes* y Mucorales), pertenecientes a la colección de Microbiología General; la mayoría de los cuales fueron aislados y caracterizados por integrantes de la cátedra y el resto, cedidos gentilmente por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Método de Sordelli Modificado. Breve descripción

Se colocaron 50 µl de una solución de leche descremada estéril en un tubo pequeño estéril de 5 ml de capacidad, con tapón de algodón. Se suspendió el microorganismo a conservar que en este caso correspondió a hongos filamentosos, en la leche. Se introdujo el tubo pequeño en un tubo de ensayo común conteniendo cloruro de calcio como indicador de humedad. El tubo de ensayo se estranguló a la llama, a unos 10 cm del fondo, para facilitar el sellado en ampolla. Luego se conectó a una bomba de vacío y, una vez secado completamente el contenido, el tubo se cerró a la llama. Las ampollas fueron almacenadas a temperatura ambiente en lugar seco.

Métodos de conservación evaluados

Se evaluaron:

1- Cepas conservadas durante 1-3 años mediante los métodos de liofilización y criopreservación a -80°C . En el primer caso el crioprotector utilizado fue una solución acuosa (20%) de leche descremada. Para el segundo, se utilizaron una solución acuosa (5%) de DMSO o glicerol (10%). (2,6)

El inóculo colocado en cada uno de los crioprotectores (al efectuar el conservado) consistió en cuatro ansadas de esporos o de micelio fúngico (según se tratara de hongos esporulados o no, respectivamente) de manera de obtener una turbidez superior a la del tubo 2 de la Escala de Mc Farland.

2- Cepas conservadas mediante Sordelli "modificado", durante 1, 2, 3, 8 y 10 años.

3- Cepas conservadas mediante supresión de la evaporación, utilizando vaselina estéril, durante 1, 2, 4, 6 y 7 años. (3,7)

Reactivación de los conservados

Para los conservados por liofilización y Sordelli "modificado" se agregó, sobre cada uno de los mismos, 50 µl de caldo extracto de malta; a continuación las suspensiones se agitaron hasta homogenización y se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, observándose cada 48-72 horas, reponiéndose el medio de cultivo toda vez que se consideró necesario. Las cepas reactivadas se controlaron hasta crecimiento visible y el tiempo máximo de incubación fue de 30 días.

Una vez desarrolladas, se sembraron sobre medios agarizados. Para *Aspergillus* y *Penicillium* se utilizó Czapeck agarizado y para *Fusarium*, Agar Papa. Para los géneros restantes se utilizó Agar Extracto de Malta.

Los conservados por congelación a -80°C se sumergieron en baño a $37-40^{\circ}\text{C}$, aunque sin permitir que la muestra alcanzara esa temperatura, de manera de efectuar el descongelado rápido (3) y a continuación se subcultivó cada uno de ellos sobre medios agarizados (de igual modo al descrito anteriormente).

Las cepas conservadas bajo vaselina estéril se reactivaron por siembra directa sobre los mismos medios de cultivo (líquidos o agarizados).

Todos los subcultivos se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante siete días.

En todos los casos se mantuvieron las condiciones de bioseguridad adecuadas, trabajando bajo campana de seguridad y evitando la generación de

aerosoles al abrir los liofilizados y al efectuar la resiembra de los conservados bajo capa de vaselina.

Identificación de los hongos reactivados

Se consideraron cepas viables cuando se observó al cabo de la incubación desarrollo visible. La identificación se llevó a cabo mediante observaciones macro y microscópicas según las claves taxonómicas propuestas por Raper y col. y Pitt y col. (8-10)

Resultados

En total se estudiaron 33 hongos: 9 especies de *Aspergillus*, 5 de *Penicillium*, 2 de *Fusarium*, 7 Hyphomycetes y un Coelomycetes (todos hongos deuteromycetes), 3 pertenecientes al Phylum Ascomycota (*Eurotium chevalieri* L. Mangin, *Emericella nidulans* [Eidam] Vuill. y *Neosartorya fischeri* [Wehmer] Malloch & Cain) y 3 Mucorales correspondientes al Phylum Zygomycota.

Cada uno de los cultivos recuperados conservó las características morfológicas macro y microscópicas y no se observaron contaminaciones con otros microorganismos ni con ácaros.

En la Tabla 1, se observa la viabilidad de las cepas CECT, conservadas mediante diferentes técnicas y los correspondientes tiempos de conservado. Todos los hongos se conservaron viables, con excepción de una de las cepas de *P. steckii* CECT 2268 mantenida, durante un año, bajo capa de vaselina.

La viabilidad de las especies conservadas por, al menos, dos métodos se consigna en la Tabla 2, habiendo sobrevivido el 100% de las mismas independientemente del método utilizado y del tiempo de conservado.

En la Tabla 3, se listan los hongos para los que se empleó exclusivamente el método de Sordelli "modificado". Sobrevivieron el 84,6% de las cepas resultando no viables uno de los dos *A. glaucus* Link y uno de los tres *M. racemosus* Fresen. mantenidos durante 8 y 3 años, respectivamente.

La viabilidad de los hongos conservados exclusivamente mediante el método de supresión de la evaporación, bajo capa de vaselina, se observa en la Tabla 4. Se obtuvo desarrollo para el 64,7% de los mismos. No se observó supervivencia para ninguna de las cepas de *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link,

Ulocladium chantarum Simmons, *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel y *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg.

Discusión y conclusiones

Las colecciones microbianas constituyen uno de los componentes de mayor relevancia para los laboratorios de Microbiología, siendo la conservación de los microorganismos uno de los capítulos de la misma que se encuentra en continuo desarrollo. La elección del método a utilizar dependerá de diferentes factores relacionados con el objetivo de la colección. Es importante considerar la cantidad, el tipo y la finalidad de los microorganismos a conservar, la frecuencia con que serán requeridos y los aspectos físicos y económicos de que se dispone.

En el caso particular de los hongos, además de las descritas en el presente informe, existen muchas otras técnicas propuestas. (2,3,10,11,13)

Si bien los métodos a largo plazo aseguran la conservación del genotipo, es importante tener en consideración que no puede descartarse la posibilidad de que se produzca algún cambio, originado durante las maniobras preparatorias para su aplicación. (3)

Uno de los pasos más importantes cuando se conserva por liofilizado es efectuar la congelación de manera lenta a fin de evitar la formación de cristales de hielo que puedan dañar las células. Otra de las condiciones importantes es el conservar las ampollas en la oscuridad (1,10). En el caso de los hongos filamentosos, se ha descrito la supervivencia de hasta 20 años, debiéndose efectuar controles cada 5 para comprobar que no hubo descenso de la viabilidad. En esta oportunidad, todas las cepas (100%) conservadas mediante esta técnica fueron reactivadas exitosamente; aunque debe tenerse presente que los conservados eran relativamente jóvenes (los más antiguos databan de 3 años), estos porcentajes son muy superiores a los informados por Szakacs (87%). (6)

Respecto de la técnica por congelado, en general, se puede afirmar que, al igual que la del liofilizado, permite conservar con mayor éxito a aquellos hongos filamentosos formadores de esporos o conidios, estando contraindicado conservar micelio (12). Si se tiene en cuenta la totalidad de los conservados

mediante este método (Tablas 1 y 2), el 90 % resultó viable. A pesar del bajo número de hongos estudiados en este trabajo, estos porcentajes obtenidos son similares a los informados por Hoffman (6) quien logró recuperar el 90% de los Basidiomycota conservados en nitrógeno líquido, e inferiores al 97,7% demostrado por Pasarell y col. (6) cuando utilizaron una temperatura de -70°C . El hecho de que una de las dos cepas de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (formadora de macroconidias) conservadas por esta técnica durante un año no haya sido recuperada, podría ser atribuido a que la temperatura de conservación fue de -80°C y no -196°C (nitrógeno líquido) como se aconseja en estos casos. (6)

Sordelli "modificado", tal como se expresara, es un método que combina el liofilizado con la técnica propuesta originalmente por Sordelli. Si bien ésta última fue ideada para conservar hongos levaduriformes (4), las modificaciones efectuadas permiten la adaptación de la misma a la conservación de hongos filamentosos con buen éxito. En nuestro caso el 93.9% de conservados fue recuperado, ya que sobre un total de 33 (Tablas 1, 2 y 3), sólo perdieron su viabilidad un *A. glaucus* Link y un *M. racemosus* Fresen. conservados durante 8 y 3 años, respectivamente; a pesar de que, para el caso de la especie de *Mucor*, fue recuperado sin problemas un conservado de mayor antigüedad.

Si bien algunos autores han descrito una supervivencia de hasta 20 años para algunos hongos filamentosos conservados bajo capa de aceite mineral, en este trabajo, la mayoría de las cepas que resultaron no viables (86%, Tablas 1,2 y 4) habían sido conservadas mediante esta técnica. Coincidentemente, Moraes Borba y col. (14) determinaron que el 58,8% de las cepas de Coelomycetes conservadas mediante esta técnica resultaron viables luego de su manutención por períodos que variaron entre los 45 y los 2 años, no obstante lo cual todas, con excepción de una, habían perdido su capacidad de esporular. De todas maneras, aunque este procedimiento no asegura la estabilidad del genotipo, teniendo en cuenta la necesidad de efectuar controles rutinarios y el uso de distintos métodos de conservación, a fin de garantizar la recuperación de las cepas conservadas (14), esta técnica es muy útil para el trabajo diario del laboratorio porque aumenta la vida media de los subcultivos en 2-3 años. (3, 12)

En el presente informe se reporta una muy buena recuperación de los cultivos fúngicos conservados por algunas de las técnicas que se utilizan en la cátedra de Microbiología General.

Agradecimientos

Este trabajo se enmarcó dentro de un Proyecto CA+D, subsidiado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral.

Tabla 1. Viabilidad de cepas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), conservadas mediante diferentes técnicas

Especies fúngicas	Métodos de elección						Método alternativo	
	Liofilizado		Sordelli "modificado"		Congelado -80°C		Bajo capa de vaselina	
	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**
<i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2948	1	2/2					1	3/3
<i>Penicillium citrinum</i> CECT 2274	3	1/1	3	1/1	2	1/1	1	3/3
	1	1/1					2	1/1
<i>P. citrinum</i> CECT 2269	3	1/1	3	1/1			1	3/3
							4	1/1
<i>P. expansum</i> CECT 2280	1	2/2			1	1/1	1	3/3
<i>P. roqueforti</i> CECT 2903	1	2/2					1	3/3
<i>P. steckii</i> CECT 2268	1	2/2					1	3/2
TOTAL		11/11		2/2		2/2		20/19

*TC: tiempo de conservado expresado en años; **CR/CS: nº de cultivos reactivados/ nº de cepas viables

Tabla 2: Viabilidad de especies fúngicas conservadas por, al menos, dos técnicas

Especies fúngicas	Métodos de elección						Método alternativo	
	Liofilizado		Sordelli "modificado"		Congelado -80°C		Bajo capa de vaselina	
	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**	TC*	CR/CS**
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.			1	1/1			2	1/1
			8	1/1			6	1/1
<i>A. flavus</i> Link	1	1/1					2	1/1
<i>A. niger</i> Tiegh. <i>nom.</i> <i>cons.</i>			1	1/1	1	3/3		
			2	1/1				
			8	1/1				
			10	1/1				
<i>A. ochraceus</i> K. Wilh.			1	1/1			4	1/1
			8	2/2			6	1/1
			10	1/1				
<i>A. terreus</i> Thom			1	1/1			4	1/1
			2	2/2			7	2/2
			8	1/1				
			10	1/1				
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	1	1/1			1	1/1	2	2/2
<i>Rhizopus</i> sp			8	1/1	1	2/2	1	1/1
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn					1	2/1	1	1/1
<i>Dreschlera hawaiiensis</i> (M.B.Ellis) Subram. & Jaim			1	2/2			2	1/1
TOTALES		2/2	18/18		8/7		13/13	

*TC: tiempo de conservado expresado en años; **CR/CS: nº de cultivos reactivados/ nº de cepas viables

Tabla 3. Viabilidad de los hongos conservados por el Método de Sordelli "modificado"

Especies fúngicas	TC*	CR/CS**
<i>Aspergillus candidus</i> Link	8	1/1
<i>A. glaucus</i> Link	3 8	1/1 2/1
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	1 3 8	1/1 2/2 1/1
<i>Penicillium roqueforti</i> Thom	2	1/1
<i>Mucor racemosus</i> Fresen.	3 8	2/1 1/1
<i>Mucor</i> sp	10	1/1
TOTAL		13/11

*TC: tiempo de conservado expresado en años

**CR/CS: n° de cultivos reactivados/ n° de cepas viables

Tabla 4. Viabilidad de los hongos conservados mediante el método de supresión de la evaporación

Especies fúngicas	TC*	CR/CS**
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church	2	1/1
<i>A. wentii</i> Wehmer	4 6	1/1 1/1
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.	2	2/2
<i>Neosartorya fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain	2	1/1
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	6	1/1
<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg	2	1/0
<i>Geotrichum candidum</i> Link: Fr.	2	1/1
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	2	2/2
<i>Alternaria</i> sp	6	1/1
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	2	2/0
<i>Ulocladium chantarum</i> Simmons	2	2/0
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel	2	1/0
TOTAL		17/11

*TC: tiempo de conservado expresado en años

**CR/CS: nº de cultivos reactivados/ nº de cepas viables

Agradecimientos

Este trabajo se enmarcó dentro de un proyecto CAI + D, subsidiado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral.

Bibliografía

1. ATCC Technical Bulletin Nº2. "Preservation and Recovery of Filamentous Fungi". 2001. Acceso por Internet: <http://www.atcc.org>
2. Floccari, M. "Conservación de Cepas de Importancia Genética". En: "Conservación de Microorganismos. Métodos Aplicados en Microbiología Clínica". III Congreso Internacional de SADEBAC. Bs. As., 1993. 16-18
3. García López, M.; Uruburu Fernández, F. "La Conservación de Cepas Microbianas". Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 2004. Acceso por Internet: <http://www.uv.es/cect>
4. Emiliani, E. "Microbiología Industrial". Cuadernillo IV Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. 1964.
5. Leardini, N. "Criopreservación: Ventajas y Limitaciones". En: "Conservación de Microorganismos. Métodos Aplicados en Microbiología Clínica". III Congreso Internacional de SADEBAC. Bs. As. 1993. 1:1-3
6. Bueno, L.; Gallardo, R. "Preservación de Hongos Filamentosos en Agua Destilada Estéril". Rev Iberoam Micol, 1998; 15:166-168.
7. Umansky, G.; Iacona, V.; Calafell, M.; González, A.; Medrano, M.; Velazco, L.; Marzocchi, V.; Guía de trabajos prácticos de la Cátedra de Microbiología General. "Conservación de Microorganismos". Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL, 1987.
8. Raper, K.; Thom, C. 1949. "A Manual of the *Penicillia*". Williams and Wilkins Co. (Baltimore).
9. Raper, K.; Fennell, D. 1965. "The Genus *Aspergillus*". Williams and Wilkins Co., (Baltimore).
10. Pitt, J.; Hocking, A. 1999. "Fungi and Food Spoilage". Aspen Publishers (Australia).
11. Smith, D. "Maintenance of Filamentous Fungi". In: "Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods". Academic Press Ltd. 1991, Chapter 5 :134-159.
12. Belloch, C. "Técnicas Moleculares Aplicadas a la Taxonomía Fúngica". Curso de post grado Universidad Nacional de Rosario, 1999.
13. Santos, I.; Abrunhosa, L.; Venancio, A.; Lima, N. "The Effect of Culture Preservation Techniques on Patulin and Citrinin

Production by *Penicillium expansum* Link". Lett Appl Microbiol 2002, 35: 272-275.

14. Moraes Borba, C.; Rodrigues, K. "Viability and Sporulating Capability of *Coelomycetes* Preserved Under a Range of Different Storage Regimes". Rev Iberoam Micol 2000, 17:142-145.