

**COMPORTAMIENTO DE *SPOROTHRIX SCHENCKII* Y
CLADOSPORIUM CARRIONII EN MEDIOS A BASE DE
EXUDADOS GOMOSOS**

**BEHAVIOR OF *SPOROTHRIX SCHENCKII* AND
CLADOSPORIUM CARRIONII IN THE CULTURE MEDIA
ON THE BASIS OF NATIVE GUMS**

Sofía Rodríguez-V.; Luz M. Mesa*;
Gisela Páez-F.**; Gladys León-P.****

RESUMEN

S. schenckii y *Cladosporium carrionii*, hongos patógenos, se cultivaron a 28°C por 11 días en medios a base de los exudados gomosos nativos de *Cedrela odorata* y *Cercidium praecox*. El aislamiento y la identificación de esos hongos se llevó a cabo usando la metodología clásica; la determinación de la biomasa y la curva de crecimiento de *S. schenckii* fue realizada en los sustratos antes mencionados. La composición de azúcares de los exudados gomo-

- * Profesora Titular. Cátedra de Micología-Escuela de Bioanálisis - Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Autora de correspondencia.
- ** Profesora Titular. Cátedra de Fermentaciones Industriales Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia.
- *** Directora del Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales. Facultad de Humanidades y Educación. Universidad del Zulia.

Recibido: 11-9-96
Aceptado: 17-10-96

Received: 09-11-96
Accepted: 10-17-96

Los medios usados mostraron la presencia de varios monosacáridos, los cuales podrían ser usados por los hongos como fuente de carbono y energía. Los resultados obtenidos en los medios de cultivo estudiados, con base en los exudados gomosos, son comparables a los observados en Sabouraud. Los hongos estudiados mostraron sus características inequívocas.

Este estudio evidenció que los medios de cultivo con base en exudados gomosos son sustratos económicos no convencionales, muy útiles para aislar y caracterizar los hongos *S. schenckii* y *C. carrionii*.

Palabras claves: *Sporothrix schenckii*, *Cladosporium carrionii*, *Cercidium praecox*, *Cedrela odorata*, exudados gomosos.

ABSTRACT

Sporothrix schenckii and *Cladosporium carrionii*, were grown at 28°C for 11 days in the culture media on the basis of native gum exudates from *Cedrela odorata* and *Cercidium praecox*. The isolation and identification of these fungi were carried out by using the standard methodology. Biomass determination and curve of growth of *S. schenckii* were done on the above substrates. The sugar composition of the used gum exudates showed the presence of many monosaccharides, which may be used for the fungi as source of carbon and energy. The results obtained in the studied culture media, on the basis of gum exudates, are comparable to those observed in Sabouraud; the studied fungi showed their unequivocal characteristics. This study evidenced that the culture media on the basis of gum exudates, are economical, no conventional substrate and very useful to isolate and characterize the fungi of *S. schenckii* and *C. carrionii*.

Key words: *Sporothrix schenckii*, *Cladosporium carrionii*, *Cercidium praecox*, *Cedrela odorata*, native gums.

INTRODUCCION

Los hongos patógenos *Sporothrix schenckii* y *Cladosporium carrionii*, productores de esporotricosis y cromomicosis respectivamente son saprófitos capaces de adaptarse y proliferar en el tejido vivo animal, cuando se inoculan por vía traumática^{6,7,11,16}.

El diagnóstico micológico de estas afecciones se basa en el aislamiento e identificación del agente causal. La demostración microscópica del hongo en preparados directos establece la presencia de la infección micótica; es indispensable la inoculación del material patológico en los medios de cultivo adecuados para su identificación inequívoca.

Se han ensayado una amplia variedad de sustratos^{1,2,5,12,17,18} para lograr el desarrollo "in vitro" de los hongos. La necesidad de medios de cultivo que faciliten el crecimiento adecuado de estos microorganismos ha estimulado las investigaciones tendentes a la búsqueda de sustratos idóneos. Los resultados halagadores, obtenidos en la identificación de hongos de diferentes géneros en medio de cultivos a base de exudados gomosos^{4,13}, justifica ampliar estas investigaciones y estudiar el comportamiento de hongos patógenos en sustratos afines. Los exudados gomosos, gomas, heteropolisacáridos ácidos e hidrocoloides, están constituidos por hexosas (galactosa, manosa, glucosa), pentosas (arabinosa, xilosa), metil pentosas (ramnosa) y ácidos urónicos (ácidos glucorónicos, 4-O metil glucurónico, galacturónico).

Se han publicado^{8,9,10,14} varios estudios relativos a la caracterización fisicoquímica y al estudio estructural de gomas, provenientes de diversas especies diseminadas en el país.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras

Los exudados gomosos de *Cercidium praecox* (yabo) y *Cedrela odorata* (cedro) se colectaron al noroeste del Municipio Maracaibo,

Edo. Zulia y en Capacho, Edo. Táchira, respectivamente. Las cepas de colección de *Sporothrix schenckii* IMT 6541 y *Cladosporium carrionii* FMC 317 fueron proporcionadas por la sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. Se usaron, además, en este estudio Bacto-peptona, dextrosa y Bacto-agar (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, USA).

Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon varias soluciones acuosas de los exudados gomosos investigados (3, 4 y 5% p/v), previa pulverización en molino de cuchillo y martillo (Retschumuhle). La solución de la goma se facilitó por agitación mecánica; se filtró y se ajustó el pH (6.5-7) por la adición de NaOH 0.1 N. Se agregó peptona (1% p/v) y agar (2% p/v), y se calentó en baño de María (100°C). Los medios líquidos, se prepararon siguiendo el procedimiento anterior, con exclusión del agar.

El medio de Sabouraud dextrosa agar usado como referencia se preparó con glucosa (20 g), peptona (10 g), agar (15 g) en agua destilada (1.000 ml). Se ajustó el pH (6.0-6.5). Los medios se esterilizaron por 15 minutos a las condiciones adecuadas (15 libras de presión y 118-121 °C).

Inoculación experimental y aislamiento de las cepas

Se prepararon suspensiones densas de *S. schenckii* y *C. carrionii* cultivadas en lactrimel, a 25 °C, por 9 y 21 días, respectivamente. Los inóculos, preparados por remoción mecánica de las colonias estudiadas, se trituraron y se suspendieron en solución salina fisiológica estéril (8-10ml). Los ratones (8) de peso promedio determinado (5-6 g) se inocularon por vía intraperitoneal, con las suspensiones de *S. schenckii* (1ml) y *C. carrionii* (0.5 ml). Se observaron las características clínicas de los ratones por 6 semanas, se sacrificaron y se les practicó la necropsia. Los órganos que mostraron nódulos o placas, se estudiaron por examen directo y cultivo. Las muestras con las formas parasitarias de los hongos inoculados se sembraron y se incubaron a 25 °C en los medios con base en *C. odorata* (EGC) y *C. praecox* (EGY) y en el de Sabouraud dex-

trosa agar (SDA) como referencia. Las colonias con características macroscópicas propias de los hongos se seleccionaron para su estudio microscópico directo con lactofenol o azul de algodón en lactofenol.

Estudio macro-microscópico de los hongos investigados

Las cepas se inocularon en placas de Petri preparadas con EGY, EGC y SDA. Se incubaron en la oscuridad a 28°C. Las características macro-microscópicas se observaron a los 14 días de incubación. Se usaron cultivos en lámina en los medios anteriores.

Cultivo por carga. Peso seco

La cepa de *S. schenckii* se cultivó y conservó en los medios sólidos empleados (EGY, EGC y SDA) a 28 °C. El inóculo (2.5 ml) se preparó a partir de una suspensión del hongo en agua destilada estéril y se transfirió asépticamente a fiolas (250 ml) que contenían los medios líquidos (EGY y EGC).

El experimento, por duplicado, se llevó a cabo en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific, model 624) en aerobiosis, a temperatura controlada (28 °C) y con agitación constante (150 r.p.m.). Se efectuaron determinaciones de la biomasa según la técnica de peso seco¹⁵.

Estudio físico-químico de los exudados gomosos investigados

La hidrólisis de los exudados gomosos (100 mg) se llevó a cabo con ácido sulfúrico (10 ml, 0.5 M). La composición de azúcares, después de la hidrólisis se evaluó por combinación de cromatografía de papel y el método fenol-sulfúrico³. Se prepararon curvas de calibración de los azúcares constituyentes de los exudados gomosos. El contenido de acidez se evaluó por volumetría de neutralización en muestras puras, previamente electrodiálizadas.

RESULTADOS

Inoculación experimental y aislamiento de cepa: La inoculación se efectuó en ratones (recién nacidos) en buenas condiciones físicas. Los animales inoculados con *S. schenckii* presentaron nódulos en pelvis, patas y abdomen, los cuales se observaron solamente en el abdomen en el caso de *C. carrionii*.

Los nódulos resultantes de la inoculación con *S. schenckii* mostraron al examen microscópico directo, la forma parasitaria del hongo. En el caso de *C. carrionii* se observaron hifas (oscuras con signos de actinofitosis y en proceso de germinación). El aislamiento de los hongos ensayados en los medios EGC, EGY y SDA se muestran en las figs. 1 y 2.

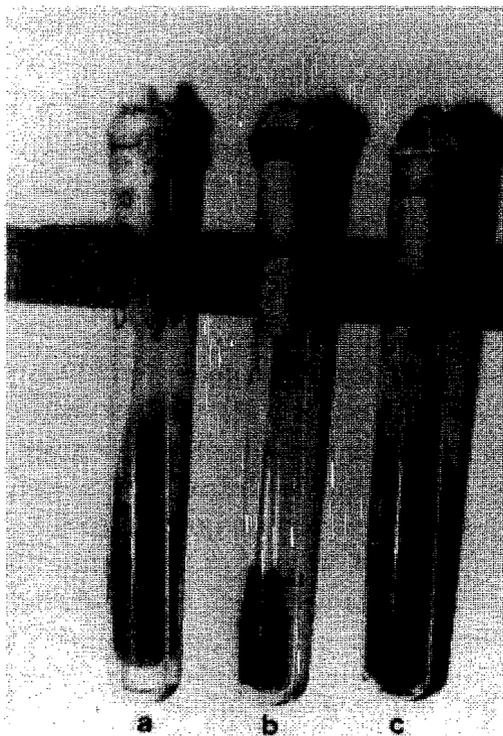


Fig. 1. *Sporothrix schenckii* IMT 6541. Aislamiento en los medios
a: EGC b: SDA c: EGY

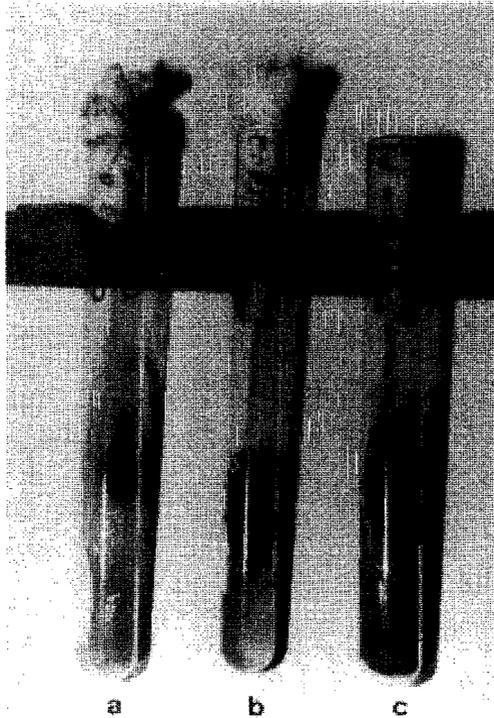


Fig. 2. *Cladosporium carrionii* FMC 317. Aislamiento en los medios a: EGC b: SDA c: EGY

Identificación de las especies: Las características macro-microscópicas que permitieron la identificación de los hongos en estudio aparecen en los Cuadros 1 y 2 y en las Figs. 3-6. Los parámetros analíticos de los exudados gomosos de *C. praecox* y *C. odorata* se muestran en el Cuadro 3.

Cultivo por carga. Peso seco: La cinética del crecimiento de *S. schenckii* en los medios de cultivo ensayados (EGY y EGC) se observa en la fig. 7.

Cuadro 1
Observaciones macroscópicas de las cepas investigadas:
Sporothrix schenckii y *Cladosporium carrionii**

Especie Investigada	Medio de Cultivo EGY	Crecimiento, cm	Características**
<i>S. schenckii</i>		1.5	Micelio aéreo ausente, colonia ligeramente plegada de color crema. En el reverso, el color varía de crema a marrón.
<i>C. carrionii</i>		1.7	Micelio aéreo aterciopelado, periferia glabra, verde grisáceo. En el reverso es negro.

* Las observaciones se realizaron a los 14 días de incubación en los medios con base en los exudados gomosos de *C. praecox* (EGY), *C. odorata* (EGC) y en Saboraud (SDA).

** Características similares se observaron en el medio EGC. *Sporothrix schenckii* en Saboraud (SDA) tuvo un mejor crecimiento (2.5 cm y micelio aterciopelado).

Cuadro 2
Observaciones microscópicas de las cepas investigadas
Sporothrix schenkii* y *Cladosporium carrionii*

Características Observadas	Especie Investigada	Medios de Cultivo		
		EGY	EGC	SDA
Conidioforos	<i>S. schenkii</i>	5.7-31.3x1.1 μ	4.4-23.1x1.1 μ	5.5-38.5x0.5-1.1 μ
	<i>C. carrionii</i>	8.55-51.3x2.8 μ	8.4-42.2x2.8 μ	6.6-58.9x1.1-2.2 μ
Conidias	<i>S. schenkii</i>	2.2x1.1-2.2 μ	2.2x1.1-2.2 μ	2.2x1.1-2.2 μ

* Las observaciones se realizaron a los 14 días de incubación en los medios a base de los exudados gomosos (EGY, EGC y SDA).

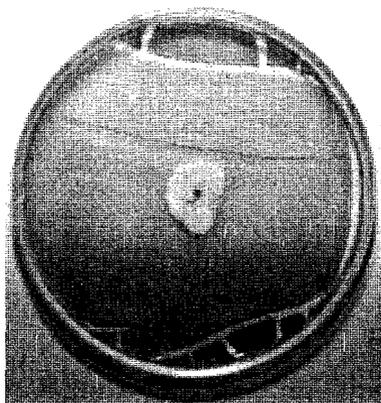
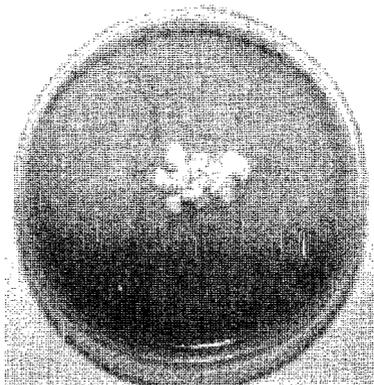
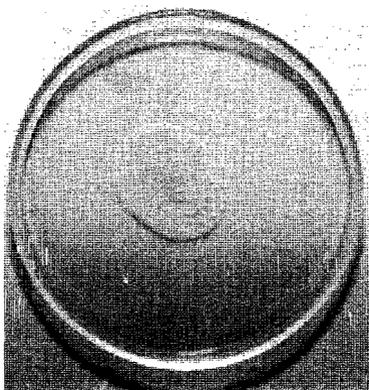
**a****b****c**

Fig. 3. Características macroscópicas de *Sporothrix schenckii* en los medios ensayados **a:** EGC **b:** EGY **c:** SDA.

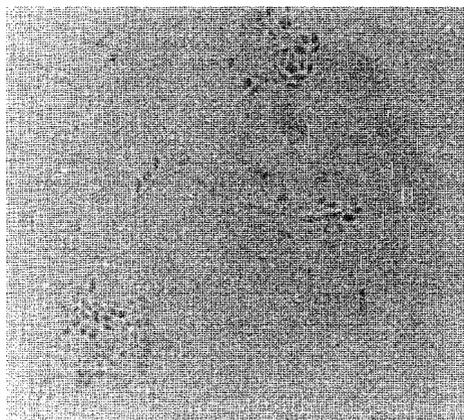
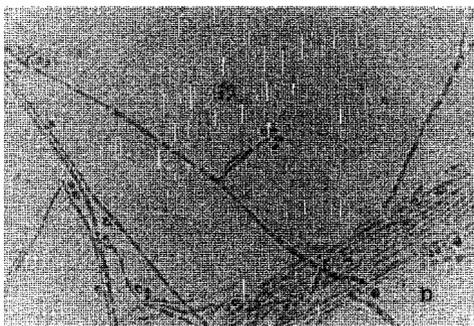
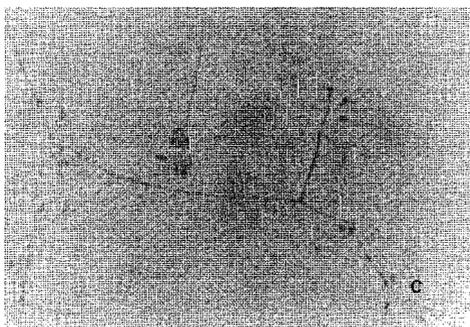
**a****b****c**

Fig. 4. *Sporothrix schenckii* en los medios a: EGC b: EGY c: SDA. Se observa micelio delgado, conidióforos simpodiales, conidias unicelulares, ovales y globosas. Aumento 175 X.

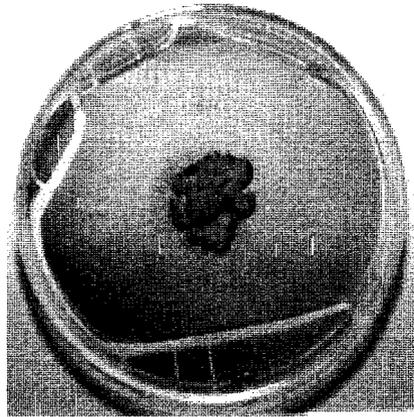
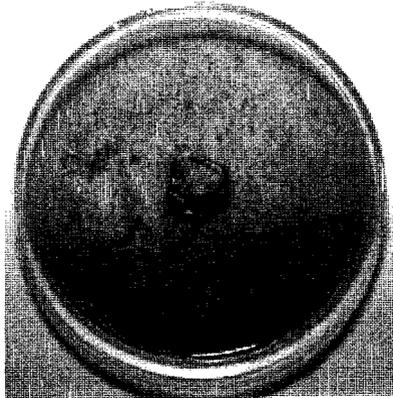
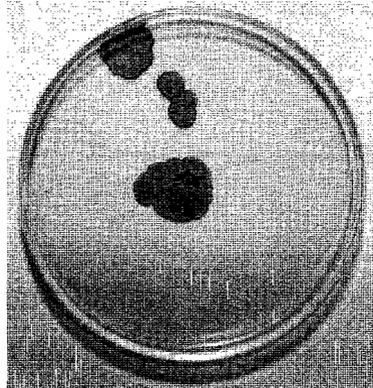
**a****b****c**

Fig. 5. *Características macroscópicas de Cladosporium carrionii* en los medios ensayados **a**: EGC **b**: EGY **c**: SDA.

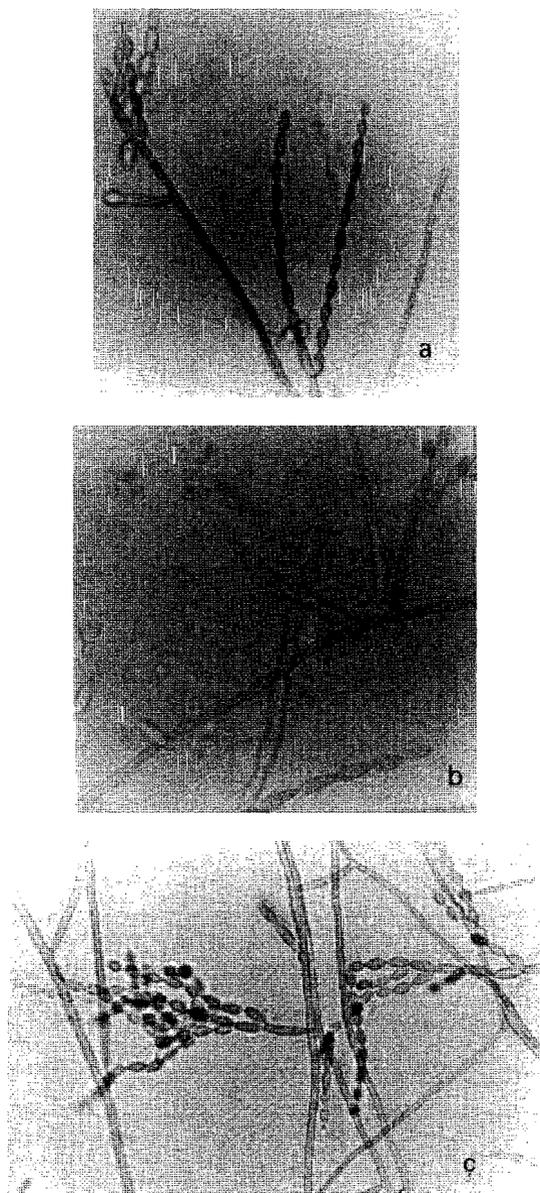


Fig. 6. *Cladosporium carrionii* en los medios a: EGC b: EGY c: SDA. Se observa micelio septado y conidias ovales en cadenas acrópetas. Aumento 175 X.

Cuadro 3
Datos analíticos de los exudados gomosos de *C. praecox* y *C. odorata*

Parámetros	Especies	
	<i>C. praecox</i>	<i>C. odorata</i>
Humedad, %	7.97	11.22
Nitrógeno, % ^a	0.55	0.18
Proteína cruda, (%N x 6.25) ^a	3.44	1.12
Viscosidad intrínseca, mL/g ^a	36	53
Acidez, % ^{a,b}	24	23
Composición de azúcares después de la hidrólisis, % ^a		
Galactosa	-	42
Arabinosa	35	14
Xilosa	41	-
Ramnosa	-	20

^a Corregido para humedad

^b Considerando que toda la acidez proviene de los ácidos urónicos (ácido -D-glucurónico y su éter).

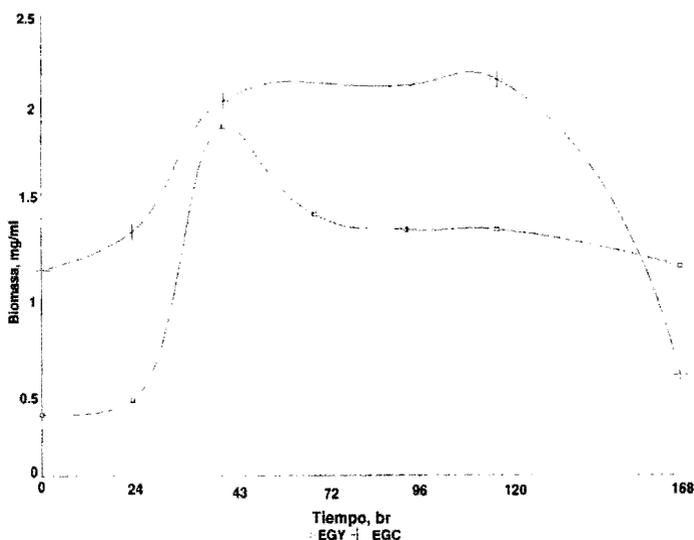


Fig. 7. Cinética de crecimiento del *Sporothrix schenckii*.

DISCUSION

Los medios de cultivo ensayados con base en los exudados gomosos de *Cedrela odorata* (EGC) y *Cercidium praecox* (EGY) se prepararon con una concentración similar de goma (3%), debido a que los estudios preliminares demostraron que dicha concentración produce un medio con una viscosidad adecuada.

La inoculación de los ratones con *Sporothrix schenckii* y *Cladosporium carrionii*, facilitó la obtención del material patológico necesario para su aislamiento primario en los substratos evaluados. Los ensayos de aislamiento, a partir del material patológico, de los hongos a investigar en los medios de cultivo con base en los exudados gomosos mostraron, a los 11 días de incubación, un crecimiento similar al exhibido en el medio Saboraud, figs 1 y 2; sin embargo, *C. carrionii* se desarrolló más rápidamente (6 días) en el medio EGY. Estos hallazgos evidenciaron que los medios ensaya-

dos son sustratos, no convencionales, adecuados para el aislamiento de los hongos investigados a partir de material infectado, por lo tanto, pueden competir con el medio Saboraud, ampliamente utilizado en estudios micológicos de aislamiento.

La eficacia del sustrato con base en la goma de *C. odorata*, se observó previamente en la identificación de hongos contaminantes, patógenos y atmosféricos^{4,13}.

El estudio macroscópico de las cepas investigadas, a los 14 días de incubación, cuadro 1, mostró un crecimiento comparable en los medios con base en los exudados gomosos y en SDA; sin embargo *S. schenckii* mostró un mayor desarrollo en SDA y micelio aéreo. Los rasgos microscópicos característicos de las especies en estudio aparecen inequívocamente en los tres sustratos (EGY, EGC y SDA), cuadro 2.

S. schenckii produjo, en todos los medios utilizados, un micelio septado, hialino, delgado que porta conidióforos (septados, hialinos, elongados, adelgazados hacia el ápice, simpodiales), fig. 5; en SDA los conidióforos tuvieron un mayor desarrollo (5.5 -38.5 μ por 0.5 - 1.1 μ) que en EGY (5.7 - 31.3 μ por 1.1 μ) y en EGC (4.4 - 23.1 μ por 1.1 μ). Las conidias (hialinas, globosas y ovales, unicelulares) en la punta de los conidióforos o en las hifas sobre pedículos, mostraron un crecimiento similar en los medios y SDA (2.2 μ por 1.1 - 2.2 μ). El análisis microscópico de *C. carrionii* destacó un micelio septado, subhialino a marrón claro con conidióforos rectos o flexuosos, ramificados o no, de color marrón claro, pared lisa con tamaño variable, en EGY (8.55-51.3 μ por 2.8 μ), EGC (8.4-42.2 μ por 2.8 μ) y SDA (6.6 - 53.9 μ por 1.1 - 2.2 μ); las conidias son ovales, en cadenas acrópetas ramificadas de pared lisa con hilum distintivo, hialinas a marrón claro, unicelulares, algunas con septos, fig. 6. Las dimensiones de los conidióforos fueron características para cada medio, cuadro 2.

Es oportuno destacar que el desarrollo de las estructuras vegetativas y de reproducción exhibidas por los hongos investigados es indicador de las bondades de los medios ensayados para propósitos de identificación.

El estudio cinético de *S. schenckii* en los medios de cultivo evaluados (EGY y EGC), fig. 7, mostró el crecimiento exponencial del microorganismo en ambos substratos, durante las primeras 48 horas; el período estacionario en EGC se observó hasta las 120 horas y luego se experimentó una disminución apreciable en la biomasa. En el caso de EGY se observó el descenso en el peso a partir de las 48 horas y permaneció estacionario hasta el final del proceso. Cabe destacar, que en EGC se obtuvo una mayor cantidad de biomasa que en EGY.

La composición de azúcares de las gomas ensayadas (hidrocoloides), cuadro 2, sugiere que algunos de los monosacáridos constituyentes pueden ser usados como fuente de carbono por los microorganismos investigados.

La complejidad y el alto peso molecular de las polisacáricos provenientes de *C. odorata* y *C. praecox* hace necesario la presencia de exoenzimas que actúen hidrolíticamente sobre la estructura del polímero y se produzcan compuestos más simples capaces de penetrar en la célula donde son atacados por enzimas intracelulares. Los posibles monosacáridos que participan en la nutrición de los hongos ensayados están en investigación.

Los resultados obtenidos en los medios de cultivo ensayados demuestran su posible competencia con Sabouraud como medio de aislamiento e identificación de hongos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BORELLI, D. Medios caseros para micología. **Arch. Venez. Med. Trop. Para. Med.** 1962;4: 301-310.
2. CERUZZI, F. Nuevo recurso vegetal para la preparación de cultivos bacteriológicos. **Rev. Fac. de Cienc. Med. Córdoba.** 1982; 40: 12-17.
3. DUBOIS, M.; GILLIS, K.; HAMILTON, J.K.; ROBERS, P. Y SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars. **Analy. Chem.** 1956; 28:350-356.
4. GONZALEZ, M., E. Aislamiento de hongos atmosféricos en exudados go-

mosos de *Laguncularia racemosa* y *Cedrela odorata*. Memorias de las VII Jornadas de la Facultad de Medicina: 59, 1995, Maracaibo.

5. HOCKING, A. y ANDREWS S. Dechloran chloranphenicol Peptona Agar and identification medium por *Fusarium* species and some *Dematiaceous hyphomycetes*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 1987; 89: 239-244.

6. KWON-CHUNG, K. Comparative study of and isolate resembling Banti's fungus with *Cladosporium trichoides*. **Sabouraudia**. 1988; 21:59-72.

7. LANGERON, M. **Precis de Mycologic. Micologie generale. Mycologie medicale**. Masson and cie. Ediciones Paris. 1954; 122-124.

8. LEON-PINTO, G.; RODRIGUEZ, O.; MARTINEZ, M.; RIVAS, C. Composition of *Cercidium praecox* gum exudates. **Biochem. Syst. and Ecology**. 1993; 21: 297-300.

9. LEON-PINTO, G.; MARTINEZ, M.; GONZALEZ-TROCONIS, N.; ROJAS, A.; LEAL, E. Estudio estructural del exudado gomoso de *Swietenia mahogoni*. **Anales de Química**. 1992; 88: 157-161.

10. LEON-PINTO, G.; ALVAREZ, S.; MARTINEZ, M.; ROJAS, A.; LEAL, E. Structural studies of *Melicocca bijuga* gum exudate. **Carbohydr. Res.** 1993; 239:257-265.

11. MACKINNON, J. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and consideration on its pathogenecity and ecology. **Sabouradia**. 1969; 7: 38-45.

12. MARQUEZ, A. y DA SILVA, A. Agua de Coco o cultivo de Cogumelos. **Rev. Bras. Pat. Clin.** 1971; 17: 7-13.

13. MESA, L. y LEON-PINTO, G. Exudado gomoso de *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) como medio de cultivo para hongos. **Invest. Ch.** 1993; 34: 85-98.

14. PINTO, G. L. DE; RODRIGUEZ O.; MARTINEZ, M. Composition of *Cercidium praecox* gum exudates **Biochem. Syst. and Ecol.** 1993; 21: 297-300.

15. PIR, S.J.: **Principales of Microbe and cell cultivation**. Oxford, Blackwell, 1975.

16. RIPPON, J. **Medical Mycology: the hatogenic fungi and the phatogenic. Actinomycetes**, 3^{era} edición. Philadelphia, W, B. Saunders company. 1988; 281-325.

17. SALAS, J. Pleomorfismo: medios a base de estiércol equino y bovino. **Act. Med. Venez.** 1968; 230-232.

18. VELEZ, H.; SANTAMARIA, L. y MONTOYA, F. El medio de Kaminski adicionado con nistatina para el aislamiento de dermatofitos y otros agentes patógenos. **Atreia**. 1989; 2: 45-49.