



Revista de la Sociedad Venezolana de
Microbiología

ISSN: 1317-973X

vrodiguelemoine@gmail.com

Sociedad Venezolana de Microbiología
Venezuela

Panizo, María Mercedes; Reviákina, Vera; Montes, Williams; González, Gladys
Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral
Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 25, núm. 1, enero-junio, 2005, pp. 136-145
Sociedad Venezolana de Microbiología
Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416547007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral

Maria Mercedes Panizo*, Vera Reviákina, Williams Montes, Gladys González

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ministerio de Salud, Caracas-Venezuela

* Correspondencia: E-mail: merceval@cantv.net

Resumen

Mantener y conservar una colección de hongos es una tarea que demanda constante dedicación y vigilancia. Requiere conocer las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los hongos, así como sus requerimientos en cuanto a los métodos de preservación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica macroscópica y microscópica de hongos levaduriformes y filamentosos, preservados en agua destilada y aceite mineral durante largos períodos de tiempo. Se escogieron al azar 411 hongos (170 levaduriformes y 241 filamentosos), todos ellos preservados por duplicado bajo capa de aceite mineral y agua por Castellani. Para la evaluación de las levaduras se realizaron pruebas rápidas, bioquímicas y fisiológicas y para los hongos filamentosos pruebas bioquímicas y cultivos en lámina. El análisis estadístico se realizó utilizando medidas de tendencia central y análisis de varianza (ANOVA). De 170 levaduras, 100% se conservaron viables, puras y estables morfológicamente por los dos métodos de preservación, durante un período de tiempo entre 2 – 48 años. De 241 hongos filamentosos, 100% se conservaron puros y viables, mientras que 95,4% se mantuvieron estables morfológicamente, por ambos métodos usados, durante un período de tiempo entre 3 – 47 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos métodos de conservación. Los métodos de conservación de agua por Castellani y capa de aceite mineral garantizan la preservación adecuada de hongos levaduriformes y filamentosos durante largos períodos de tiempo, asegurando viabilidad, pureza y estabilidad morfológica.

Palabras Clave: Mantenimiento, preservación, hongos, Método de Castellani, aceite mineral

Maintenance and preservation of fungi indistilled water and mineral oil

Abstract

To maintain and to conserve a fungal culture collection is a task that demands constant dedication and surveillance. It requires to know morphological, physiological and biochemical characteristics of fungi, as well as their requirements for preservation methods. The main objective of this work was to evaluate viability, purity and morphological stability of yeasts and moulds, long-term preserved under mineral oil and distilled water. 411 fungi were random chosen (170 yeasts and 241 moulds), all of them kept in duplicate under mineral oil and distilled water method described by Castellani. The yeasts evaluation was carried out by physiological, biochemical and quick tests. For filamentous fungi, biochemical and thin plate cultures were done. The statistical analysis was carried out using central tendency measures and variance analysis (ANOVA). 170 (100%) of the yeasts were conserved viable, pure and morphologically stables for the two preservation methods, during 2-48 years. From 241 filamentous fungi, 100% were conserved

pure and viable, while 95,4% stayed morphologically stable, for both methods used, during 3-47 years. No statistically significant differences were found when comparing both conservation methods. Preservation methods like distilled water and under mineral oil guarantee long-term appropriate conservation of yeasts and moulds, assuring viability, purity and morphological stability.

Key words: Maintenance, preservation, fungi, Castellani method, mineral oil.

Recibido 23 septiembre de 2005;

Aceptado 18 de octubre de 2005

Introducción

Mantener y conservar en buenas condiciones una colección de hongos, es una tarea que demanda constante atención y vigilancia. Se debe conocer, no sólo lo que concierne a las características morfológicas, crecimiento, propiedades bioquímicas y fisiológicas de los hongos, sino también los requerimientos en cuanto a los métodos de preservación más favorables para su conservación y mantenimiento posterior. Esto es sumamente importante, ya que los objetivos primordiales que persigue la conservación de cepas de hongos son: pureza, viabilidad y estabilidad morfológica y genética.

Varios métodos se han descrito a lo largo del tiempo para lograr estos objetivos y ninguno de ellos es de utilización general. Los métodos más comúnmente utilizados en el mantenimiento y preservación de hongos son: liofilización [1-6], congelación [7-10], bajo capa de aceite mineral [11-14] y en agua destilada estéril [6, 15-21]. Cada uno es escogido tomando en cuenta el tipo de hongo que se quiere preservar, la cantidad de cepas que se quieren mantener, con qué finalidad serán utilizadas y cuáles son los recursos, tanto humanos como en materiales y equipos, que dispone el laboratorio para dedicarse a esta tarea.

Una colección de cultivos de hongos en un laboratorio de micología, como la que funciona en el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", es un instrumento valioso y de uso permanente para los micólogos. Esta colección se ha formado con cepas de hongos aislados a partir de muestras clínicas, ambientales, de alimentos, cosméticos y de procedencia vegetal y animal, de importancia médica, epidemiológica, industrial e histórica, todas ellas muy útiles para las actividades docentes y de investigación que desarrolla el departamento. Mantiene además cepas de referencia para control de calidad y presta servicios de identificación y suministro de cepas para docencia e investigación a nivel nacional.

Las cepas de esta colección se han mantenido conservadas durante largos períodos de tiempo mediante dos métodos: agua destilada y aceite mineral. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica macroscópica y microscópica de hongos levaduriformes y filamentosos, preservados por estos dos métodos.

Materiales y métodos

Se utilizaron 411 hongos: 170 levaduriformes (11 géneros y 25 especies) y 241 filamentosos (50 géneros y 101 especies), escogidos al azar de la Micoteca del Dpto. de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Todos se encontraban preservados por duplicado por dos métodos: Agua según el Método de Castellani y bajo capa de aceite mineral.

El método de Castellani se basa en la conservación del cultivo del hongo en agua destilada estéril [15,16]. El método de capa de aceite mineral consiste en sembrar trozos de cultivos de hongos ya desarrollados, en tubos que contienen agar dispuesto en forma de taco y posteriormente se cubren con una capa de aceite mineral estéril [13, 14]. El agar para conservación usado en este trabajo fue el Extracto de Malta.

Para la evaluación de la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las levaduras, se usaron las siguientes pruebas [22]:

- Siembra de la levadura en agar Sabouraud dextrosa y agar Extracto de Malta.
- Observación macro y microscópica de los cultivos.
- Pruebas rápidas: Producción de tubo germinal (filamentización en suero), producción de clamidosporas en agar bilis y resistencia a la cicloheximida.
- Pruebas convencionales: Estudio de las características macro y microscópicas en medios sólidos y líquidos, prueba de asimilación de carbohidratos según el método de Haley Estándar y prueba de fermentación de carbohidratos según el método de Wickerham.
- Pruebas complementarias: Hidrólisis de úrea, reproducción sexual (producción de ascas en agar Gorodkova) y termotolerancia (crecimiento a 37° y 42°C en agar Sabouraud dextrosa).

Para la evaluación de la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de los hongos filamentosos, se usaron las siguientes pruebas:

- Siembra del hongo filamentosos en agar Sabouraud y agar Extracto de Malta.
- Observación de las características macroscópicas.
- Cultivo en lámina con agar Extracto de Malta y agar Papa
- Observación microscópica de los cultivos.
- Hidrólisis de úrea.

Los hongos fueron sometidos a una estricta revisión de sus características morfológicas macroscópicas, considerándose color, textura y tamaño de las colonias. Las características microscópicas fueron evaluadas por microscopía de luz, utilizando examen directo con lactofenol o azul de algodón de los cultivos en lámina para los hongos filamentosos y directamente de los cultivos recién desarrollados para las levaduras. Se tomaron en consideración todas las características taxonómicas descritas en la literatura para cada género y especie de hongo evaluado: forma, tamaño y disposición de las conidias, presencia de ascas y ascosporas para ciertos géneros de levaduras, desarrollo de cuerpos fructíferos como cleistotecios y color, forma y tamaño del micelio [23].

A través de estas pruebas también se verificó si los hongos mantenían intactas sus propiedades fisiológicas y bioquímicas, necesarias para su correcta identificación taxonómica.

Para el análisis estadístico se utilizaron las medidas de tendencia central (media y desviación estándar). Se estimó la eficiencia de cada método de preservación por el porcentaje de supervivencia y la preservación de las características morfológicas de cada cepa durante su período de permanencia en la colección. Para comparar ambos métodos de preservación se usó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

Todas las cepas de hongos estudiados (levaduriformes y filamentosos) se mantuvieron puros y viables por ambos métodos de preservación. De ellos, 97% se mantuvieron estables morfológicamente tanto en sus características macroscópicas como microscópicas. El 3% restante mantuvo sus caracteres morfológicos macroscópicos estables, pero al realizar la observación microscópica, se evidenciaron alteraciones morfológicas y ausencia de esporulación.

De 170 levaduras estudiadas, el 100% se mantuvieron puras, viables y estables morfológicamente, por los dos métodos de preservación usados. El tiempo de preservación varió entre 2 a 48 años (media: 25 años) y fueron subcultivadas en promedio cada año y medio ($1,5 \pm 0,1$) durante ese tiempo, siguiendo el cronograma de mantenimiento establecido para estos hongos. A pesar del tiempo de preservación, todas las levaduras mantuvieron intactas sus propiedades fisiológicas y bioquímicas y su identificación taxonómica se correspondió con la identificación inicial realizada al momento del ingreso de la cepa a la colección. (Tabla 1).

De 241 hongos filamentosos estudiados, el 100% se conservaron puros y viables, mientras que 95% (230 de 241) se mantuvieron estables morfológicamente a nivel macroscópico y microscópico. El tiempo de preservación varió entre 3 a 47 años (media: 25 años) y fueron subcultivados en promedio una vez cada año y cuatro meses ($1,4 \pm 0,3$) durante ese tiempo, siguiendo el cronograma establecido para el mantenimiento de estos hongos; sus propiedades bioquímicas y fisiológicas se mantuvieron intactas, así como su identificación taxonómica inicial al ingreso a la colección. Los hongos que no se mantuvieron estables a nivel microscópico (5%) fueron 5 cepas de *Epidermophyton floccosum* y 6 cepas de *Microsporum gypseum*, las cuales a nivel macroscópico presentaron todas las características de crecimiento correspondientes a sus respectivos géneros, pero fueron incapaces de esporular, fenómeno conocido como pleomorfismo. Debido a la ausencia de las características microscópicas necesarias para su correcta identificación taxonómica, estos hongos debieron ser eliminados de la colección.

Se obtuvieron excelentes resultados de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica con hongos levaduriformes y filamentosos, preservados por ambos métodos, que tenían largos períodos de tiempo sin subcultivar, antes de ser ingresados en el cronograma de mantenimiento de la micoteca. (Tabla 2).

Al comparar ambos métodos de preservación para la conservación de hongos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Discusión

La Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", tiene 50 años de funcionamiento ininterrumpido, desde su creación en 1955. Su objetivo general es la preservación de cepas de hongos, en su mayoría autóctonas de nuestro país, con fines docentes y de investigación.

Tabla 1. Hongos levaduriformes preservados en agua destilada estéril y aceite mineral en diferentes períodos de tiempo.

Género y especie	C	AP	PS	TP	VP	EM
<i>Candida albicans</i>	52	1982 1997	1,6	6-21	+	+
<i>Candida famata</i>	2	1983 1984	1,5	19-20	+	+
<i>Candida glabrata</i>	4	1984 1994	1,4	9-20	+	+
<i>Candida guilliermondii</i>	2	1988 1994	1,3	9-15	+	+
<i>Candida intermedia</i>	2	1982 1986	1,5	17-21	+	+
<i>Candida lipolytica</i>	2	1994	1,3	9	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	4	1955 1986	1,4	17-48	+	+
<i>Candida pelliculosa</i>	5	1976 1992	1,8	11-27	+	+
<i>Candida sake</i>	1	1985	1,6	18	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	8	1955 1996	1,5	7-48	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	61	1986 2001	1,7	2-17	+	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	1992 1997	1,5	6-11	+	+
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	3	1990 1997	1,6	6-13	+	+
<i>Geotrichum candidum</i>	2	1989	1,4	14	+	+
<i>Hanseniospora uvarum</i>	1	1985	1,6	18	+	+
<i>Hansenula polymorpha</i>	1	1982	1,5	21	+	+
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	1	1991	1,5	12	+	+
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	1984	1,5	19	+	+
<i>Kluyveromyces vanudenii</i>	1	1985	1,5	18	+	+
<i>Pichia anomala</i>	4	1976 1992	1,8	1-27	+	+
<i>Pichia guilliermondii</i>	1	1990	1,6	13	+	+
<i>Prototheca zopfii</i>	3	1985 1988	1,3	15-18	+	+
<i>Saccharomyces rouxii</i>	5	1982 1988	1,7	15-21	+	+
<i>Trichosporon sp.</i>	1	1992	1,4	11	+	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> +	1	1991	1,5	12	+	+

C: Cantidad; **AP:** Año de preservación; **PS:** Promedio de la cantidad de subcultivos realizados durante el tiempo de conservación; **TP:** Tiempo de preservación; **VP:** Viabilidad y pureza; **EM:** Estabilidad morfológica.

Los métodos de preservación de Agua por Castellani y bajo capa de aceite mineral empleados en la micoteca, fueron escogidos tomando en cuenta inicialmente los recursos, tanto humanos como en equipamiento, que disponía la micoteca en sus inicios, pero, con el pasar de los años, se mantuvieron en el tiempo, demostrando su rentabilidad y su elevada capacidad de preservación de cepas de hongos. Ambos métodos son sencillos, económicos, poco laboriosos y requieren poco espacio para el almacenamiento de las cepas, además de ser los más recomendados para el mantenimiento de hongos aislados de material clínico. En esto coinciden la mayoría de los autores sobre el tema [6,11-21,24-26].

Tabla 2. Hongos levaduriformes y filamentosos preservados en agua destilada estéril y aceite mineral con períodos de tiempo sin subcultivar.

Género y especie	N° Cepa	AI	T sin S	CS	PS	TP	VP	EM
<i>Absidia blakesleana</i>	6607	1961	23	1984	1,4	42	+	+
<i>Aspergillus orizae</i>	6614	1961	22	1983	1,5	42	+	+
<i>Aspergillus clavatus</i>	15879	1976	7	1983	1,5	27	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	16940	1977	6	1983	1,5	26	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6430	1960	23	1983	1,5	43	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8141	1975	8	1983	1,5	28	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	22236	1980	2	1982	1,3	23	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	2062	1956	27	1983	1,4	47	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	5057	1958	26	1984	1,4	45	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	10865	1971	13	1984	1,4	32	+	+
<i>Aspergillus terreus</i>	22237	1980	2	1982	1,5	23	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	1061	1955	28	1983	1,3	48	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	1073	1955	28	1983	1,4	48	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	1065	1955	28	1983	1,4	48	+	+
<i>Chrysosporium sp.</i>	9450	1966	18	1984	1,4	37	+	+
<i>Colletotrichum sp.</i>	18903	1978	5	1983	1,3	25	+	+
<i>Emmonsia crecens</i>	14878	1975	9	1984	1,4	28	+	+
<i>Emmonsia parva</i>	14856	1975	9	1984	1,5	28	+	+
<i>Exophiala dermatitidis</i>	14525	1966	17	1983	1,5	37	+	+
<i>Exophiala dermatitidis</i>	10038	1969	15	1984	1,5	34	+	+
<i>Exophiala dermatitidis</i>	13445	1974	10	1983	1,4	29	+	+
<i>Exophiala dermatitidis</i>	10037	1969	14	1983	1,4	34	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	18647	1978	7	1985	1,5	25	+	+
<i>Fusarium solani</i>	20673	1979	4	1983	1,5	24	+	+
<i>Fusarium solani</i>	20330	1979	4	1983	1,5	24	+	+

<i>Fusarium solani</i>	18765	1978	6	1984	1,5	25	+	+
<i>Fusarium solani</i>	18181	1978	6	1984	1,5	25	+	+
<i>Hendersonula toruloidea</i>	11826	1973	10	1983	1,5	30	+	+
<i>Madurella grisea</i>	6211	1959	25	1984	1,4	44	+	+
<i>Madurella grisea</i>	4011	1957	27	1984	1,2	46	+	+
<i>Madurella grisea</i>	12007	1973	11	1984	1,4	30	+	+
<i>Microsporum fulvum</i>	22796-8	1980	3	1983	1,5	23	+	+
<i>Microsporum fulvum</i>	22796	1980	3	1983	1,3	23	+	+
<i>Microsporum fulvum</i>	20612	1979	4	1983	1,5	24	+	+
<i>Neotestudina rosatii</i>	14862	1975	8	1983	1,5	28	+	+
<i>Paecilomyces sp.</i>	10887	1969	18	1987	1,5	34	+	+
<i>Phialophora gougerotii</i>	4000	1957	37	1994	1,5	46	+	+
<i>Phoma pyrenochaeta</i>	22235	1980	15	1995	1,1	23	+	+
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	6584	1961	23	1984	1,5	42	+	+
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	14815	1975	8	1983	1,3	28	+	+
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	13680	1973	10	1983	1,3	30	+	+
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	6203	1959	24	1983	1,4	44	+	+
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	6209	1959	24	1983	1,4	44	+	+
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	12004	1973	12	1985	1,5	30	+	+
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	8650	1965	20	1985	1,5	38	+	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	29429	1982	8	1990	1,6	21	+	+
<i>Rhizopus oligosporus</i>	29209	1981	2	1983	1,3	22	+	+
<i>Rhizopus sp.</i>	19678	1978	5	1983	1,3	25	+	+
<i>Scedosporium apiospermum</i>	19741	1978	7	1985	1,4	25	+	+
<i>Scedosporium apiospermum</i>	6547	1961	24	1985	1,5	42	+	+
<i>Sporothrix schenckii</i>	6589	1961	24	1985	1,3	42	+	+
<i>Sporothrix schenckii</i>	6187	1959	24	1983	1,3	44	+	+
<i>Trichophyton mariatii</i>	20610	1979	13	1992	1,6	24	+	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20611	1979	8	1987	1,5	24	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	20613	1979	4	1983	1,5	24	+	+

AI: Año de ingreso; **T sin S**: Tiempo (años) sin subcultivar; **CS**: Control de subcultivos; **PS**: Promedio de subcultivos calculado a partir del año de control de subcultivos; **TP**: Tiempo de preservación calculado a partir del año de ingreso; **VP**: Viabilidad y pureza; **EM**: Estabilidad morfológica.

El porcentaje de viabilidad obtenido en esta investigación es comparable al de otros estudios relacionados, e inclusive ligeramente superior, así como el porcentaje de mantenimiento de las propiedades morfológicas macroscópicas y microscópicas [6,11-21,24-26]. Esto probablemente se debe al establecimiento de un control riguroso de subcultivos que se mantiene en la colección, con el cual se vigila que la viabilidad y las características morfológicas y fisiológicas se mantengan en el tiempo, evitando la pérdida de cepas, lo cual también está asegurado al

mantener cada cepa de hongo por duplicado por dos métodos de preservación simultáneamente.

El hecho de que las cepas de *E. floccosum* y *M. gypseum* no hayan mantenido sus características microscópicas, probablemente tenga explicación en el hecho de que, al ser guardadas, el inóculo utilizado no fue suficiente o no se respetó el tiempo óptimo de crecimiento de los mismos para obtener una esporulación adecuada, lo que favorece el pleomorfismo y la posterior pérdida de la cepa.

La mayoría de los autores sobre este tema considera que en la mayoría de los hongos preservados, la conservación en agua por Castellani o bajo capa de aceite mineral no altera parámetros como viabilidad, esporulación, actividad fisiológica, tasa de crecimiento y virulencia durante su almacenamiento. Aunque no están descritos en la literatura intentos formales para verificar la presencia de alteraciones de las características fenotípicas y genotípicas de los hongos después de largos tiempos de preservación, en este estudio todas las cepas fueron ensayadas para comprobar el mantenimiento de sus propiedades fisiológicas y bioquímicas, así como características morfológicas, y el 97% de ellas mantuvo sus propiedades e identificación taxonómica original al ingreso a la colección [13,14,18,19,24].

Para que estas características se mantengan en el tiempo, los autores recomiendan no sólo un riguroso control de subcultivos para su mantenimiento, sino que al recuperar los hongos después de los períodos de preservación se utilicen medios que favorezcan la esporulación, como agar Extracto de Malta, agar Papa y particularmente agar Lactritmel en el caso de los dermatofitos. Estos medios, además de favorecer la esporulación, permiten a las colonias de hongos expresar características de color, textura y producción de pigmentos, esenciales para su correcta identificación taxonómica.

Conclusiones

Los métodos de conservación de agua por Castellani y capa de aceite mineral, garantizan la preservación adecuada de hongos levaduriformes y filamentosos durante largos períodos de tiempo, asegurando viabilidad, pureza y estabilidad morfológica. Son de bajo costo y fácil manejo, pero necesitan de constante vigilancia y atención por parte del personal que se ocupa del mantenimiento de una colección de hongos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Fonacit por el financiamiento parcial de esta investigación (Proyecto Lab N° 2000001587).

Referencias

- [1] Annear DI. Preservation of yeasts by drying. Austral J Exp Biol 1963; 41: 575-80.
- [2] Bosmans J. Ten years lyophilization of pathogenic fungi. Mycopathol et Mycol Appl 1974; 3: 13-23.
- [3] Ellis JJ, Roberson JA. Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. Mycologia 1968; 60: 399-405.

- [4] Crusius I, Schoenlein H, Okino LK, Lucon MM. Survival of fungi preserved by lyophilization after 49 years. *Rev Microbiol* 1993; 24(3): 207-11.
- [5] Hatt H. American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, Rockville. 1980.
- [6] Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses* 1998; 41: 255-7.
- [7] Carmichael JW. Frozen storage for stock cultures of fungi. *Mycologia* 1956; 46: 378-81.
- [8] Kramer CL, Mix AJ. Deep freeze storage of fungus cultures. *Trans Kans Acad Sci* 1957; 66: 58-64.
- [9] Carmichael JW. Viability of mold cultures stored at -20°C. *Mycologia* 1962; 4: 432-6.
- [10] Shuk WW. Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia* 1960; 52: 527-9.
- [11] Ferreti de Lima R, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 191-6.
- [12] Borba CM, Rodrigues KF. Viability and sporulating capability of *Coelomycetes* preserved under a range of different storages regimens. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 142-5.
- [13] Coimbra dos Santos A, Cavalcanti MA. Preservation of dermatophytes under mineral oil. *Bol Micol* 1994; 9: 31-4.
- [14] Silva M, Cavalcanti MA. Viability and sporulation in time of coelomycetes in the mycotheca (URM) Recife-Brasil preserved under mineral oil. *Bol Micol* 1994; 9: 19-23.
- [15] Castellani A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathol et Mycol Appl* 1963; 20: 1-6.
- [16] Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* 1967; 70: 181-4.
- [17] Hartung C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 1989; 106: 73-9.
- [18] Odds FC. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 413-5.
- [19] Rodrigues EG, Livio VS, Lacaz CS. Preservação de fungo e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34(2): 159-65.

- [20] Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 166-8.
- [21] Salas J. Micoteca. Conservación en agua. *Acta Med Venez* 1969; 14: 416-7.
- [22] Lodder J. The Yeasts. A taxonomic study. J. Lodder Editor. North-Holland/American Elsevier. 1974. 34-113 pp.
- [23] GS de Hoog, Guarro J, Gené J & Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands/Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. 2000.
- [24] López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Castañón-Olivares LR. Comparative study of two culture conservation methods in medical mycology. *W J Microbiol Biotech* 1999; 15: 471-4.