

## **2. Observación de hongos de interés industrial**

En esta práctica se realizarán observaciones en fresco de varios hongos de interés industrial.

### **2.1 Preparaciones para el estudio microscópico de los aislados**

Existen tres métodos muy comunes para el examen al microscopio de los hongos filamentosos.

#### **2.1.1 Preparación en fresco**

- Colocar una pequeña fracción de la colonia con cierta cantidad de agar en un porta con azul de lactofenol
- Separar la colonia con unas pinzas y cubrir con el cubre-objetos
- Presionar suavemente con unas pinzas o el extremo de un lápiz
- Examinar la preparación primero con 10X y después con 40X. Si se observan estructuras sospechosas se puede observar con 100X (objetivo de inmersión)

Esta técnica a menudo rompe las débiles estructuras fructificantes de los hongos filamentosos, haciendo difícil observar las características de esporulación.

#### **2.1.2 Preparación con cinta adhesiva transparente**

Este método de preparación es útil ya que se conserva las características de agrupamiento de las esporas de algunos hongos más delicados.

- Adherir una cinta adhesiva transparente (tipo Fixo) sobre la colonia para tomar una porción del micelio aéreo
- Colocar una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos
- Pegar un extremo de la cinta adhesiva cargada con el micelio en el extremo del porta
- Presionar la cinta sobre el colorante para permitir que el micelio empape en la solución y entonces cuidadosamente pegar el extremo de la cinta adhesiva al porta con cuidado de que no se formen burbujas de aire
- Observar al microscopio de igual forma que en el método anterior excepto que no se observa con inmersión

#### **2.1.3 Microcultivo en porta**

En los casos en los que las técnicas anteriores no den buenos resultados o cuando se requiere mantener la preparación por algún tiempo para observaciones posteriores, se recomienda la técnica de microcultivo en porta. Aunque es algo más laboriosa, se consiguen preparaciones de alta calidad en las que se pueden observar perfectamente las estructuras de diferenciación como esporas y sus agrupamientos.

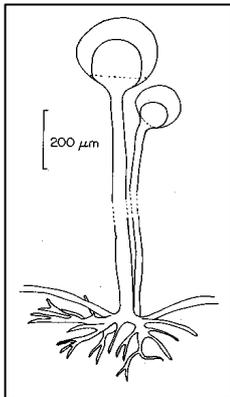
- Poner un trozo de papel de filtro o algodón en el fondo de una placa Petri
- Colocar sobre ella dos pequeños palillos de vidrio o de otro material, que servirán de soporte para el portaobjetos
- Colocar un cilindro de medio de agar como dextrosa, patata, etc., sobre el porta, este se puede cortar con un sacabocados
- Inocular en tres o cuatro sitios diferentes del cilindro de agar con una pequeña porción de la colonia del hongo
- Calentar ligeramente un cubre por paso a través del mechero e inmediatamente colocar sobre la preparación, con lo que el agar es ligeramente fundido, lo que sella completamente el cubre contra la preparación
- Pipetear una pequeña cantidad de agua en el fondo de la placa para saturar el papel de filtro
- Colocar la tapa de la placa e incubar a temperatura ambiente o a 30°C durante 3-5 días
- Cuando aparezca un crecimiento visible, puede separarse el cubre suavemente de la superficie del agar, con cuidado de no romper el micelio
- Colocar el cubre sobre una gota de lactofenol en un segundo porta
- Una vez retirado el cubre, se puede retirar también el bloque del agar y hacer con él una segunda preparación con azul de lactofenol
- Si no puede retirarse el cubre del agar, ya que se ha pegado firmemente a él y se ha secado lo suficiente, se puede llevar a cabo la preparación añadiendo a los bordes del cubre la solución del colorante de lactofenol. Éste entra en la preparación por capilaridad y tiñe las estructuras.

## 2.2 Términos útiles en el examen de hongos

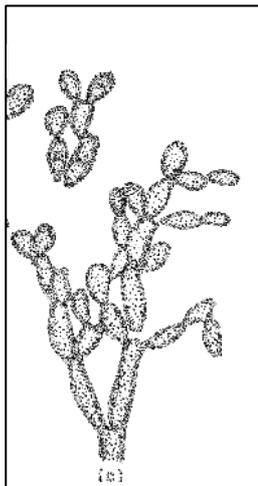
En el examen de las colonias y en las observaciones microscópicas, se utilizan una serie de términos que son útiles para describir las observaciones y que conviene recordar.

1. La unidad fundamental microscópica de un hongo es la **hifa**. La combinación de hifas da lugar al crecimiento en masa del conocido **micelio**.
2. Las hifas divididas en células individuales por paredes transversales son denominadas **septadas** y las que no se subdividen **aseptadas**.
3. La porción del micelio que se extiende hacia el sustrato del medio de cultivo se denomina micelio vegetativo.
4. La porción que se proyecta hacia el exterior se denomina **micelio aéreo** o **micelio reproductor**.
5. La identificación de los hongos está primariamente basada en las diferencias morfológicas de las estructuras reproductivas y la forma en que las **esporas** o **conidios** se producen en células especializadas.

## 2.3 Morfología al microscopio de diferentes hongos de interés industrial

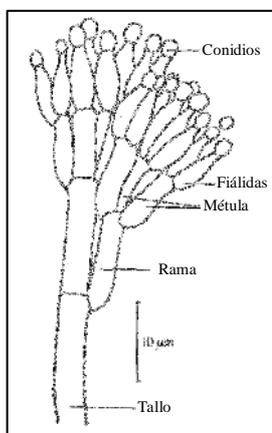


*Rhizopus oryzae*: Las especies del género *Rhizopus* son comunes en muchos tipos de materiales y son frecuentes contaminantes en el laboratorio. Crecen muy bien en la mayoría de los medios de cultivo para hongos, especialmente en agar-patata a 24°C. Presentan colonias algodonosas que se extienden por toda la placa. Las esporas se encuentran en esporangios globosos y grandes en forma de embudo. Esta especie fue utilizada en la segunda guerra mundial por los prisioneros británicos en Java para fermentar la soja y hacerla más digerible. De esta forma se complementaba la escasa dieta de la que disponían.



*Cladosporium cladosporioides*: las especies del género *Cladosporium* son también bastante comunes. La mayoría son patógenos de plantas, aunque algunas son saprofitos y originan problemas de putrefacción.

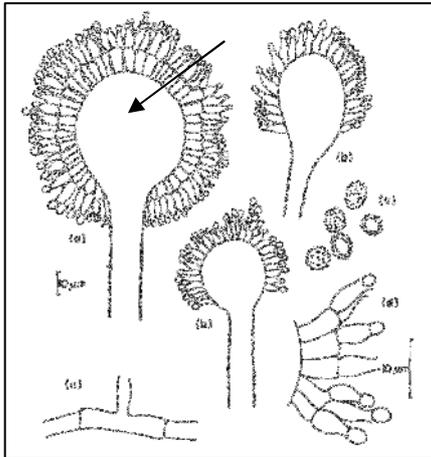
*C. cladosporioides* presenta conidios no esféricos septados y ramificados. Es un hongo saprofito que se ha aislado del aire, suelo, textiles y pintura. Crece bien en agar-patata a 24°C. Se utiliza en la industria como microorganismo de referencia para los ensayos de resistencia de diferentes materiales a los hongos.



*Penicillium chrysogenum*: las especies del género *Penicillium* están muy extendidas y con frecuencia son agentes de destrucción. Algunas especies se utilizan en fermentaciones a nivel industrial para la obtención de diferentes compuestos como el ácido cítrico, ácido glucónico, penicilina, etc.

En general los miembros de este género presentan micelio vegetativo septado, sin color o coloreado. Este micelio aparece en parte sumergido y en parte aéreo. Las diferentes partes en que se divide el micelio reproductor aparecen en la figura. *P. chrysogenum* presenta colonias azul-verdosas muy

extendidas, con el reverso amarillento. Esta especie produce penicilina, glucosa oxidasa, etc. Crece en agar-extracto de malta a 24°C.



*Aspergillus flavus* : las especies de este género crecen en casi todos los sustratos. Tienen especial importancia en el deterioro de alimentos. Producen toxinas peligrosas para el hombre y los animales. No todas las especies son perjudiciales, algunas se utilizan en la industria por sus capacidades fermentativas. Así se utilizan en la producción de sake, ácido oxálico, ácido cítrico, glucónico, etc. Los conidióforos emergen de forma perpendicular desde unas células especializadas con paredes engrosadas, denominadas “pie” [(e) en la figura]. La presencia de células pie, los diferencia del género *Penicillium*. Los conidióforos terminan en una forma globosa denominada “vesícula” (flecha en la figura). Estas vesículas soportan las fiálidas y las métulas.

*A. flavus* presenta conidióforos largos y tienden a redondearse para dar una vesícula globosa. Las fiálidas ocupan la circunferencia completa. Las fiálidas son uniseriadas o biseriadas. Los conidios son amarillo-verdosos. Crece bien en agar-patata y en agar-extracto de malta a 24°C.

## 2.4 Colorantes y medios de cultivo para hongos

### Azul de lactofenol:

Azul algodón 0,05 g en 100 ml de lactofenol

Lactofenol	
Fenol	10 g
Ácido láctico	10 g
Glicerol	20 g
Agua destilada	10 ml

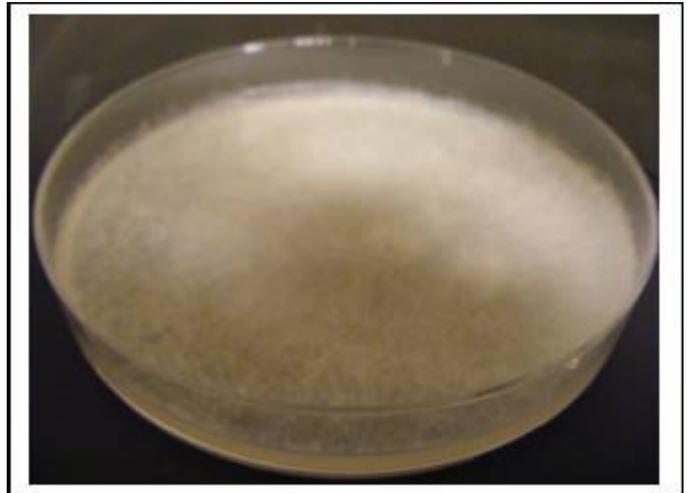
Agar-malta	
Extracto de malta	20 g
Glucosa	20 g
Micopeptona	1 g
Agar	16 g
Agua destilada	1000 ml

Agar-glucosa-patata	
Patatas peladas	300 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

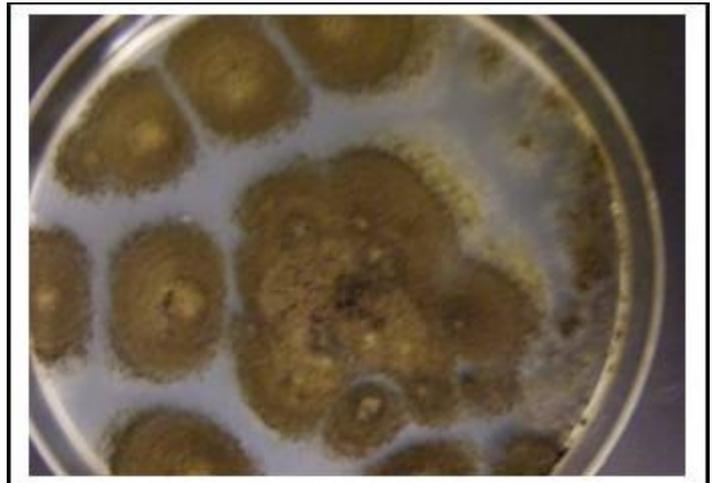
Hervir las patatas en 500 ml de agua, escurrir en una gasa y añadir agua destilada al filtrado hasta un volumen final de 1 l. Añadir el agar y la glucosa antes de esterilizar.

# Hongos

## 1.- Rhizopus



## 2.- Aspergillus



## 3.- Penicillium



### 3. Aislamiento y observación de hongos del suelo

#### 3.1 Fundamento

Los hongos filamentosos son microorganismos que están presentes en el suelo. Vamos a aislar y observar dichos hongos mediante inoculación de muestras de suelo en los medios adecuados.

#### 3.2 Material necesario

- Muestra de suelo tamizada
- Medio de Czapek
- Placas de Petri estériles
- Agua estéril
- Pipetas y tubos estériles
- Baños

Medio de Czapek	
Sacarosa	3%
Nitrato sódico	0,2%
Cloruro potásico	0,05%
Glicerofosfato de magnesio	0,05%
Sulfato de hierro (II)	0,001%
Sulfato potásico	0,035%
PH	6,8

Este medio de cultivo contiene sacarosa como única fuente de Carbono y Nitrato como única fuente de Nitrógeno. En este medio los hongos suelen crecer bien, mientras que el crecimiento bacteriano se ve dificultado en la mayoría de los casos.

Para preparar el medio se disuelven 33,5g en un litro de agua destilada, una vez disuelto se añade agar al 2%. Fundir y repartir en tubos a razón de 20ml/tubo. Esterilizar en autoclave.

#### 3.3 Procedimiento

1. Pesar un gramo de suelo. Colocarlo cuidadosamente en un frasco con 10ml de agua estéril. Agitar vigorosamente y dejar reposar unos minutos. Considerar esta dilución como la  $10^{-1}$ .
2. Transferir 0.5 ml de esta dilución a un tubo con 4.5 ml de agua estéril. Agitar bien y dejar reposar. Esta es la dilución  $10^{-3}$ .
3. Seguir así hasta la dilución  $10^{-10}$ . Para el experimento inocularemos las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$ .
4. Para el aislamiento de los hongos se sigue el mismo procedimiento que para los Actinomicetos o bien se puede colocar 1 ml de la dilución adecuada en el interior de una placa de Petri estéril y después añadir con cuidado el medio de cultivo,

que se habrá mantenido en sobrefusión a 50°C. Se gira suavemente la placa y se deja solidificar.

5. Incubar a 30°C durante varios días.
6. Contar las colonias aparecidas y observar con lupa el micelio vegetativo.