

5. Cultivos

En la naturaleza los hongos crecen sobre cualquier sustrato orgánico, pero en el laboratorio se les debe proveer de un medio nutritivo especial. Los cultivos para identificación se suelen hacer sobre medios gelificados y los experimentos fisiológicos en sustratos líquidos, a veces agitados para proveer de oxígeno a las colonias sumergidas.

Se puede demostrar la presencia ubicua de las esporas de los mohos y su efecto destructivo incubando hojas, granos, frutos, cuero o papel, en condiciones húmedas. Sobre el cuero y los granos aparecerá *Penicillium* o *Aspergillus*, mientras que *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium* se encontrarán en los frutos, especialmente tomates, frutillas y cítricos respectivamente.

Aislamiento

La técnica de dilución empleada para aislar bacterias también es útil con los hongos, pero a veces conviene sembrar el inóculo tomado directamente de la superficie de material en estudio. En otros casos se depositan sobre el medio los granos o trozos de muestra, previamente desinfectados por inmersión sucesiva en etanol 70% v/v y en una solución al 10% v/v de agua lavandina concentrada durante 2 minutos, y enjuagados una vez con agua estéril (1).

Las especies que se encuentran en ambientes donde abundan las bacterias se cultivan en medios adicionados de compuestos antibacterianos, por ejemplo cloranfenicol 100 mg / litro que se agrega antes de la esterilización del medio. Puede ser reemplazado por otros antibióticos que se añaden asepticamente al medio estéril fundido, tal como clortetraciclina (10 mL de solución acuosa al 1% p/v en 1 litro de medio) (2).

Un cultivo puro de levaduras se suele obtener dispersando el material tomado con el asa mediante estrías sobre la placa de medio, tal como se procede con bacterias. En cambio, un cultivo puro de mohos se puede lograr apoyando sucesivamente el gancho con el inóculo

en varios puntos de la placa de medio selectivo. En algunos casos esta técnica no es satisfactoria y entonces conviene hacer una dispersión de las esporas sobre la superficie de agar-agua estéril. Si son suficientemente grandes se ven bajo la lupa estereoscópica y con una aguja se toma el trozo de agar que contiene a la espora y se la transfiere al sustrato conveniente (cultivo monospórico).

El rosa Bengala es adecuado para aislar los mohos porque reduce la extensión de las colonias sin afectar la germinación de las esporas (0,5 mL de solución acuosa al 5% p/v en 1 litro de medio). Los cultivos se incuban en la oscuridad para evitar la degradación fotoquímica del colorante, formando un compuesto inhibitor. También se puede usar en los aislamientos dicloran (= botrán = 2,6 dicloro 4-nitroanilina) (1 ml de solución etanólica al 0,2% p/v por litro de medio). Ambos compuestos son termoestables (3).

Las cepas de levaduras productoras de ácido acético desarrollan en un medio con 5 mL de ácido acético glacial por litro (2). La mayoría de los hongos xerófilos crece sobre al agar glicerol pues tiene una actividad de agua = 0,95 (1). Los micoparásitos, tales como *Gliocladium* o *Trichoderma*, no requieren un medio especializado, pero otros sólo crecerán en cultivo xénico. Los mohos que atrapan nemátodos, por ejemplo *Arthrobotrys* o *Dactylella*, se suelen cultivar en una placa de agar donde se depositó suelo rico en humus o estiércol de caballo para la provisión de los mismos (4).

Inoculación

Se utiliza un alambre de nicrom (medida 20) doblado como un gancho en la punta y montado en un mango incombustible. Inmediatamente antes de usarlo se debe flamear el alambre hasta que se torne rojo y luego enfriar (cerca de la llama). La boca del tubo que va a recibir el cultivo también debe ser flameada después de abrirlo. Para reducir el peligro de contaminación con los esporos suspendidos en el aire, la tapa de la caja de Petri debe ser abierta sólo en un ambiente donde no haya corrientes de

aire y levantada apenas lo suficiente para permitir la introducción del gancho.

Con el gancho se toma un pequeño manojito del crecimiento del hongo y se siembra. A veces sólo es necesario tocar con el gancho un punto del sustrato, en otros casos es mejor inocular el medio en varios puntos o extender el inóculo en rayas. Cuando se utilizan tubos, luego de la inoculación se dejan las tapas ligeramente flojas mientras crecen los hongos para permitir la respiración.

Incubación

En general los cultivos se colocan a 25°C durante 5 días, pero los hongos xerófilos o acidófilos suelen requerir 1 ó 2 semanas (2). Los cultivos de *Fusarium* y algunos otros se dejan a la temperatura ambiente durante 7 días bajo la alternancia de luz fluorescente + luz negra con obscuridad para favorecer la esporulación (5).

Mantenimiento

Debido a los peligros de contaminación con mohos perjudiciales, infestación por ácaros y degeneración de los cultivos, la conservación de los aislados se hace sobre un medio natural gelificado dentro de tubos con tapa, que se incuban en ambientes donde las superficies son desinfectadas frecuentemente. Los cultivos se guardan, protegidos del polvo y la humedad, a temperatura ambiente o refrigerados y los trasplantes se hacen cada tres o doce meses respectivamente. La mayoría de los cultivos se pueden mantener vivos por un período más largo cubriéndolos con una capa de un centímetro de espesor de vaselina o agua esterilizada (6).

Recuento

El medio conveniente debe suprimir el crecimiento bacteriano, proveer los nutrientes necesarios para todos los hongos, aún los relativamente fastidiosos, y reducir el crecimiento radial de las colonias para permitir el recuento de los que desarrollan más lento. La reunión de agar malta peptona y agar Czapek levadura en el agar sacarosa malta peptona provee los sustratos necesarios,

y se agrega bilis para reducir el crecimiento radial sin suprimir la esporulación (7). Otros medios comunes adicionados de rosa Bengala o dicloran, son usados con frecuencia (2).

La homogeneización del material blando se hace un frasco estéril con perlas de vidrio agitando enérgicamente durante 2 minutos, o en una licuadora estéril durante 30 segundos o en una bolsa plástica estéril dentro de un homogeneizador peristáltico durante 1 minuto. Se usa como diluyente una solución de peptona al 0,1% p/v (8) adicionada de 0,05% de tween 80 p/v (3). También se puede emplear en algunos casos solución fisiológica, solución reguladora de fosfatos o agua destilada con o sin humectante (9). El material duro se muele en un molinillo de granos previamente desinfectado con alcohol.

Para evitar el choque osmótico en los productos secos o jugos concentrados, se diluye con una solución de sacarosa o glucosa al 20% p/v y si se trata de productos salados se emplea un diluyente con 5% p/v de NaCl. Si la muestra tiene gran cantidad de azúcares y es muy ácida, se diluye (1 + 1) con solución de peptona al 0,1% p/v y se ajusta el pH a 3,5 - 4,0 (3).

Se hace una dilución seriada con el mismo diluyente, agitando continuamente el líquido y transfiriendo con rapidez las alícuotas para evitar la sedimentación de las esporas o células. Se deposita 0,1 mL de cada dilución en la superficie de una placa de medio vaciada en una caja de Petri de 9 cm de diámetro, y se extiende por la superficie con una fina varilla de vidrio doblada en ángulo. Se incuba dentro de una bolsa plástica acompañada de un vaso con agua para evitar la desecación, durante 3 a 7 días a 25°C en las regiones subtropicales, a 30°C en las tropicales y a 22°C en las templadas y frías (3). Se consideran las placas que tengan entre 10 y 100 colonias de mohos o levaduras (8).

Se calcula el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro, multiplicando el número de colonias observadas en la placa por la inversa de la dilución sembrada en la

misma y por 10, debido a que se utilizó 0,1 mL de dilución.

Medios de cultivo

- **Los usados corrientemente para mohos y levaduras son:**

Agar avena. Harina de avena 30 g, agar 20 g, agua 1 litro (10).

Agar harina de maíz. Harina de maíz 30 g, agar 20 g, agua 1 litro (10).

Agar malta. Extracto de malta 20 g, agar 20 g, agua 1 litro (10).

Agar papa zanahoria. Papa 20 g, zanahoria 20 g, agar 20 g, agua 1 litro (10).

Agar Sabouraud. Miel de abejas (o glucosa) 20 g, peptona 10 g, agua 1 litro (6).

- **Para recuento, identificación y otros fines se utilizan:**

Agar agua. Agar 20 g, agua 1 litro (6).

Agar excremento de conejo. Colocar 2 ó 3 boñigas en cada tubo, volcar agar agua (6).

Agar glicerol. Glucosa 10 g, peptona 5 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, agua 1 litro, glicerol 220 g, agar 15 g, pH 5,6 (1).

Agar Czapek levadura. Fosfato dipotásico 1 g, solución de Czapek 10 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 30 g, agar 15 g, agua destilada 1 litro (2).

Agar Czapek glicerol. Ingredientes del agar Czapek levadura disueltos en una mezcla de 250 mL de glicerol y 750 mL de agua destilada (2).

Agar diclorán cloranfenicol. Glucosa 10 g, peptona 5 g, extracto de levadura 5 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro, cloranfenicol 0,1 g, diclorán (0,2% p/v en etanol) 1 mL (2).

Agar-diclorán-glicerol. Glucosa 10 g, peptona 5 g, fosfato monopotásico 1 g, extracto de levadura 5 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, agar 20 g, cloranfenicol 0,1 g, diclorán (0,2% p/v en etanol) 1 mL, glicerol 220 g, agua csp 1 litro ($a_w=0,955$) (2).

Agar glucosa triptona levadura. Glucosa 100 g, triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, cloranfenicol 0,1 g, agar 20 g, agua corriente 1 litro (2). Se suele adicionar 0,03 g de azul tripán al medio neutro (11).

Agar Gorodkova. Glucosa 1 g, triptona 10 g, extracto de levadura 2 g, agar 20 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (12).

Agar malta acético. Extracto de malta 20 g, extracto de levadura 5 g, agar 20 g, agua 1 litro. esterilizar a 120 °c durante 15 minutos. Agregar 5 ml de ácido acético glacial al medio estéril, fundido y tibio (pH aprox. 3,8) (2).

Agar malta glucosa. Extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua 1 litro (2).

Agar malta glucosa sal. Extracto de malta 20 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 100 g, glucosa 120 g, agar 20 g, agua 1 litro, $a_w=0,88$. Se calienta en autoclave con vapor fluente durante 30 minutos o en baño de agua hirviente (2).

Agar malta levadura. Extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 5 g, glucosa 10 g, agar 20 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (12).

Agar PmTG (aislar y mantener quitridios). Leche peptonizada 1 g, triptona 1 g, glucosa 5 g, agar 10 g, agua destilada 1 litro (26)

Agar mPmTG (morfología de quitridios) . Leche peptonizada 0,4 g, triptona 0,4 g, glucosa 2 g, agar 10 g, agua destilada 1 litro. Después de varios días se agrega agua estéril para la dispersión de las zoosporas (26)

Agar papa glucosa / sacarosa. Papa 200 g, agua 1 litro, agar 20 g, glucosa ó sacarosa 20 g (10).

Agar peptona. Peptona 5 g, glucosa 10 g, fosfato dipotásico 1g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,2 (10).

Agar sacarosa malta levadura. Sacarosa 30 g, extracto de malta 15 g, extracto de levadura 5 g, triptona 2 g, bilis 2 g, nitrato de sodio 0,5 g, cloranfenicol 0,1 g, agar 20 g, agua 1 litro, pH 6,8 (7).

Medio base carbonado. Glucosa 10 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro (13).

Medio base nitrogenado. Sulfato de amonio 5 g, fosfato monopotásico 5 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro (13).

Medio base para inhibidores. Triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 5 g, agua 1 litro (13).

Medio base para fermentación. Triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, solución etanólica al 1% de azul de bromotimol 2,5 mL, agua 1 litro. Se añade 20 g del azúcar a fermentar (13).

Medio de Hagem. Extrato de malta 5 g, glucosa 5 g, fosfato monopotásico 0,5 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, cloruro de amonio 0,5 g, solución de citrato férrico al 1% 0,5 ml, agar 15 g, agua 1 litro (24).

Medio de Ingestad. Solución de Ingestad adicionada de 1,5% de agar (25).

Medio Melin Norkins. Cloruro de calcio 0,05 g, cloruro de sodio 0,025 g, fosfato monopotásico 0,5 g, fosfato diamónico 0,25 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,15 g, citrato férrico (al 1% p/v) 1,2 mL, glucosa 25 g, agua 1 litro, pH 5,3 (24).

Medio Melin Norkins modificado. Cloruro de calcio 0,05 g, cloruro de sodio 0,025 g, fosfato monopotásico 0,5 g, fosfato diamónico 0,25 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,15 g, cloruro férrico (al 1% p/v) 1,2 mL, extracto de malta 1,5 g, sacarosa 10 g, agua 1 litro (14).

Medios M/20 ó M/40. Agar-malta con 20 o 40 g respectivamente, de sacarosa (10).

Medio sin vitaminas. Glucosa 10 g, sulfato de amonio 5 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro (4).

Medio urea. Extracto de levadura 0,1 g, fosfato monopotásico 1 g, fosfato disódico 1 g, urea 20 g, solución de rojo de fenol al 1% 1 mL, agua 100 mL (13).

Medio sintético. Glucosa 5 g, nitrato de amonio 1 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,5 g, fosfato

monopotásico 1 g, agar 20 g, trazas de Fe, Mn y Zn, agua 1 litro (4).

Solución concentrada de Czapek. Nitrato de sodio 30 g, cloruro de potasio 5 g, sulfato de magnesio 5 g, sulfato ferroso 0,1 g, agua destilada 100 mL (2).

Solución de Ingestad. K_2SO_4 56 μ M, KNO_3 77 μ M, KH_2PO_4 38 μ M, $K_2HPO_4 \cdot 4H_2O$ 35 μ M, NH_4NO_3 586 μ M, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 29 μ M, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 50 μ M, H_3BO_3 4 μ M, $Mn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 1.6 μ M, $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ 2.4 μ M, $Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0.1 μ M, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 μ M, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02 μ M. pH 4,5 (25).

Los medios con granos, tubérculos, raíces y frutas son los más satisfactorios. En general no es conveniente el uso de medios sintéticos preparados con sales minerales y carbohidratos pues con frecuencia los hongos no desarrollan sus formas típicas y los azúcares que estimulan el crecimiento somático, tienden a suprimir la esporulación. El agar-papa-zanahoria es preferible antes que el agar-papa-glucosa, pues no solo es bueno para la conservación de los hongos sino que también estimula la esporulación. El agar-excremento de conejo es útil para los hongos coprófilos.

Cuando se usan hortalizas o frutas para preparar los medios, se las debe cortar o rallar antes de pesarlas. Se cuecen en un baño de agua durante 1 hora. Después se cuela el líquido por un tamiz o tela. La harina de maíz y la avena se pasan a través de una tela, retorciéndola. Luego se disuelve el agar mediante una ebullición adicional y se agregan los otros ingredientes. Generalmente se usa agua corriente pues contiene oligoelementos, pero se debe controlar si hay inhibidores.

Las semillas de girasol, amapola o cebolla se utilizan como cebos de algunos hongos acuáticos. Se hierven durante unos 10 minutos. Luego se las toma con una pinza estéril, se aprietan hasta romper la cáscara y se colocan en la muestra de agua (10).

Cuando el medio está listo se lo fracciona llenando los frascos o tubos hasta la mitad mediante un embudo con un trozo de tubo de goma en el vástago y una pinza de Mohr para controlar el flujo,

sostenido por un aro ajustado con una nuez a un soporte universal. No hay que ensuciar la boca de los frascos o tubos con el medio porque se favorece la contaminación. Durante esta operación, el grueso del medio se mantiene caliente en un baño de agua. Después se ponen las tapas sin ajustarlas y se procede a la esterilización.

Se suele conservar los medios en frascos o tubos con tapa a rosca y arandelas resistentes a la temperatura, pues una vez que el medio ha sido esterilizado y la tapa ajustada, permanece estéril y sin secarse durante largo tiempo. Comúnmente después de la esterilización los tubos se dejan enfriar en posición inclinada hasta que gelifique el agar.

Esterilización

Se lleva a cabo en un autoclave a 120°C durante 15 - 20 minutos o una olla a presión a 110°C durante 30 - 40 minutos. Luego de apagar la fuente de calor se debe dejar los frascos en el autoclave o la olla hasta que la presión haya descendido al nivel ambiente. Luego de retirar los recipientes se dejan enfriar antes de ajustar las tapas (10).

La temperatura alcanzada por el vapor de agua a 2,066 kg/cm² de presión absoluta es 120,6 °C. La presión absoluta es la suma de la presión atmosférica del lugar (0,8 kg/cm² en las ciudades de Salta y Jujuy) y la indicada por el manómetro del autoclave. También se puede hacer por ebullición durante 20 -30 minutos en cada uno de tres días consecutivos, dejando a la temperatura ambiente entre cada calentamiento.

Las cajas de Petri de vidrio se esterilizan a 170°C durante 1 hora en un horno de aire caliente y se retiran cuando se enfriaron. Antes de la esterilización las placas se deben colocar en latas con tapa, o envolver cada una con papel. Con frecuencia el papel se torna quebradizo y se rompe, por lo que existe peligro de contaminación cuando se las guarda.

La alternativa es el uso de las cajas de Petri plásticas ya esterilizadas. Estas cajas se pueden reusar mojándolas con alcohol y secándolas rápidamente, o esterilizándolas en un recipiente cerrado

con pequeños trozos de algodón embebidos en formol, durante toda la noche. En este último caso, a la mañana siguiente se airean bien en un ambiente aséptico (10).

Cuando las cajas están listas, se colocan los frascos con el medio de cultivo en el horno de microondas o en agua hirviendo hasta fundirlo y luego se dejan enfriar hasta unos 60°C. Después de flamear las bocas de los frascos, se vierte el medio en las cajas y se deja endurecer. Se debe levantar la tapa de las placas sólo lo suficiente para introducir la boca del recipiente, reduciendo así el riesgo de contaminación. Se distribuye a razón de unos 15 mL de medio en cada caja de Petri.

Determinación de residuos fungistáticos

▪ en el material de vidrio

Lavar 4 cajas de Petri (A) con el procedimiento habitual del laboratorio y otras 4 (B) con el mismo procedimiento pero enjuagarlas doce veces con agua destilada. También lavar otras 4 cajas (C) pero no enjuagarlas. Esterilizarlas el procedimiento habitual.

Preparar una suspensión poco densa de levaduras en una solución estéril de tween 80 al 0,05% y hacer diluciones decimales hasta 10⁻⁴. Colocar en cada caja 1 mL de cada dilución, volcar 15 mL de agar Sabouraud fundido y enfriado a 45°C, y mezclar cuidadosamente por desplazamiento horizontal. Incubar las placas a 25°C durante 3 ó 7 días. Contar las colonias. Una diferencia > 15% entre A y B indica la presencia de residuos inhibitorios del detergente, y entre C y A demuestra que las propiedades inhibitorias del detergente desaparecen con el enjuague ordinario (15).

▪ en el agua

Preparar 2 frascos de medio sintético sin agar con 200 mL del agua desconocida y 2 con 200 mL del agua de control. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Preparar una suspensión poco densa de levaduras en una solución estéril de tween 80 al 0,05% y

sembrar 1 mL en cada frasco. Incubar a 25°C durante 3 ó 7 días.

Hacer diluciones decimales sucesivas de cada frasco hasta 10^{-4} y sembrar 0,1 mL de cada una en sendas placas de agar Sabouraud. Incubar a 25°C durante 3 ó 7 días. Contar las colonias. Si la relación recuento agua desconocida/ recuento control es $< 0,8$ se encuentran sustancias inhibitoras en el agua, si es 0,8 a 1,2 no hay inhibidores presentes y si es $> 1,2$ se hallan fuentes estimuladoras del crecimiento (15).

Microcultivo

Las estructuras esporíferas se rompen con facilidad cuando se las manipula. Es por eso que muchas especies se hacen crecer entre porta y cubreobjetos microscópicos para facilitar la observación según se muestra en la figura 1.

Sobre un portaobjetos flameado se coloca un pequeño cuadrado de 10 mm de lado que se corta de una placa de medio estéril. Se inoculan los bordes con el hongo. Luego se coloca un cubreobjetos que ha sido esterilizado por inmersión en alcohol y flameado. El portaobjetos se apoya sobre dos varillas de vidrio en una caja de Petri donde, para mantener la humedad, se colocó en el fondo algodón mojado con agua estéril. El hongo crece en el espacio entre el cubre y el portaobjetos. Cuando ha crecido lo suficiente se puede observar directamente bajo la lupa, o bien se descarta el medio y se hacen dos preparaciones una con el cubreobjetos y otra con el portaobjetos, utilizando lactofenol.

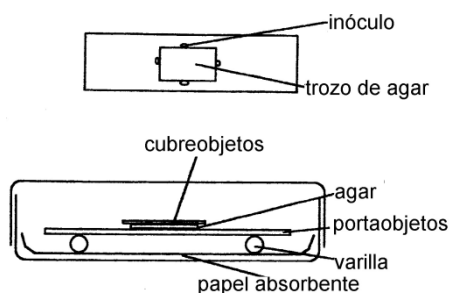


Figura 5-1. Preparación de un microcultivo (10).

Identificación de levaduras

La forma no es un indicio para la identificación de las especies, ni la variedad morfológica en un mismo cultivo es una prueba de la contaminación del mismo. El comportamiento fisiológico es muy importante para la identificación. Mientras que las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género, las características bioquímicas definen la especie de la levadura, por ejemplo la utilización de compuestos carbonados (almidón, L-arabinosa, cadaverina, celobiosa, 2-cetogluconato, citrato, eritritol, galactosa, inositol, lactosa, lisina, maltosa, manitol, melibiosa, α -metilglucósido, rafinosa, ramnosa, sacarosa, trehalosa, xilosa) y nitrogenados (nitratos), el crecimiento a 37 °C, la fermentación de glucosa y sacarosa, la necesidad de vitaminas, la resistencia a la cicloheximida, la hidrólisis de urea o el desarrollo en presencia de algunos inhibidores (acetato de sodio 1%, cloruro de sodio 16%, glucosa 60%) (13).

La identificación sólo puede llevarse a cabo sobre una cepa en cultivo puro, previamente aislada en una placa de medio gelificado. Se comienza examinando el aspecto de los cultivos tras incubación a 28°C durante 3 días o más. Se observa el aspecto del cultivo en medio líquido, la formación de sedimento y su aspecto (fino, grueso), la película superficial y la producción de gas. Se examina el cultivo en el mismo medio con agar para definir el tamaño de las colonias, la forma (contornos nítidos o irregulares, convexas o cóncavas), la superficie (mate o brillante) y la pigmentación.

Las características micromorfológicas se estudian sobre preparaciones microscópicas efectuadas en estado fresco. La aptitud para la filamentación se manifiesta en un microcultivo sobre agar harina de maíz tras una incubación de 3-5 días. Se observa si se trata de pseudomicelio o micelio verdadero, además la abundancia y ramificación. La formación de clamidoconidios es característica de

algunas especies y ocasionalmente se puede ver en cultivos viejos de otras. Las balistosporas al ser proyectadas al aire se acumulan sobre la tapa de la caja de Petri.

Para la identificación de las levaduras ascomicéticas es necesario poner en evidencia las ascas y las ascosporas. Al no tener todas las especies las mismas exigencias, se deben utilizar simultáneamente varios medios de esporulación y sembrarlos a partir de un cultivo en fase exponencial (16).

El método de identificación simplificado dado por Déak & Beuchat (13) permite la rápida y correcta identificación del 91% de las levaduras, e incluye todas las comunes en los alimentos. Las pruebas de asimilación se llevan a cabo agregando los azúcares al medio base nitrogenado estéril y los compuestos con nitrógeno al medio base carbonado.

La necesidad de vitaminas se demuestra volcando una gota de una suspensión de células en agua estéril sobre un medio sin vitaminas y como testigo se emplea el mismo sustrato adicionado de 10 mL/L de extracto de levadura al 2%. La fermentación se demuestra por el cambio de pH y la retención de gas en el pequeño tubo invertido colocado dentro del medio base con glucosa o sacarosa.

Para demostrar el crecimiento a baja actividad agua, alta acidez o la resistencia a la cicloheximida, se agrega al medio base para inhibidores estéril, 160 g de cloruro de sodio ó 600 g de glucosa ó 10 mL de ácido acético glacial ó 10 mL de una solución de cicloheximida al 1%. La hidrólisis de urea se observa por la alcalinización del medio de cultivo (13).

Con el fin de favorecer la producción de ascosporas, a partir de un cultivo de 24-36 hs en agar malta levadura, sembrar abundante cantidad en la cara superior de un bloc de yeso (2 x 2 x 0,5 cm) colocado en una caja de Petri con agua estéril, también hacer estrias sobre el agar Gorodkova y agar papa zanahoria. Incubar a temperatura ambiente entre 7 y 20 días. Examinar periódicamente los preparados en

fresco con azul-lactofenol, observar si hay producción de ascas, la forma y facilidad de ruptura, el número y la forma de las ascosporas y su posición en el asca (12).

Identificación de mohos comunes

Hacer repiques de un cultivo puro en tres puntos equidistantes de cada placa con los medios de cultivo agar malta glucosa, agar Czapek y agar Czapek glicerol e incubar a 25°C durante 7 días, excepto el cultivo en agar papa sacarosa que se incuba a la temperatura ambiente con luz solar indirecta. Además repicar en estrias sobre dos tubos de agar malta e incubar uno a 5°C y el otro a 37°C.

Medir el diámetro de las colonias, observar y registrar el aspecto macromorfológico. Hacer preparaciones en fresco y/o microcultivos para apreciar las características micromorfológicas. Si es necesario prolongar la incubación. Para la identificación consultar las claves de Pitt & Hocking (2) y Samson *et al* (17).

Recuento microscópico de mohos

Colocar en el círculo central de la cámara de Howard, una gota de la muestra bien mezclada y diluída con agua o azul-láctico, de tal manera que la concentración de residuo sólido de la suspensión sea 8-9%. Depositar el cubreobjetos de tal manera que el material se distribuya por todo el círculo y se formen los anillos de Newton en las franjas laterales. El material examinado en cada campo microscópico tiene un volumen definido.

Se observan al menos 25 campos microscópicos separados en cada carga de la cámara. Si tres trozos de hifas sumados miden 1/6 del campo, se considera positivo dicho campo. Si se necesitan más de tres trozos para lograr esa longitud, se considera como un campo negativo. Examinar al menos dos cargas y calcular el porcentaje de campos positivos (18).

Recuento de mohos y levaduras

Suspender 10 g de la muestra en 90 mL de diluyente estéril (10^{-1}), pasar 1 mL a un tubo con 9 mL de mismo (10^{-2}). El diluyente contiene peptona 1 g, polisorbitano 80 (tween) 0,5 mL, agua 1 litro (3). Colocar 0,1 mL de cada dilución en la superficie de una placa de medio de cultivo y extender con una varilla de vidrio doblada en ángulo recto. Incubar durante 5 días a 22-25°C. Observar las placas que tengan entre 10 y 100 colonias de mohos o levaduras.

Suspender los productos secos en una solución de sacarosa al 20% p/v. Emplear un diluyente con 5% p/v de NaCl para los productos salados. Si la muestra es muy ácida, ajustar el pH de la suspensión a 3,5-4,0. En general se emplea agar diclorán cloranfenicol, para recuento de levaduras en ausencia de mohos se utiliza agar glucosa triptona levadura. Si se trata de productos secos se emplea agar diclorán glicerol, para los salados se usa agar malta glucosa sal, y cuando son ácidos agar malta acético (2).

Cultivo de hongos ectomicorrizantes

Las especies comestibles comprenden setas epígeas y trufas hipógeas, pero muchos de los hongos micorrizantes son tóxicos, letales o no. Las setas micorrícicas entre ellas *Lactarius deliciosus*, *Boletus edulis*, *Cantarellus cibarius*, *Tricholoma matsutake* y las trufas *sensu lato* (*Tuber*, *Terfezia*) sólo pueden crecer sobre las raíces de algunos árboles y arbustos formando una estructura combinada con los extremos de las raicillas y engrosándolas.

El cultivo de trozos de las setas o trufas para obtener micelio, se hace sobre los medios de Hagem o Melin-Norkran modificado. Después se logran los plantines micorrizados depositando las esporas fúngicas o el micelio, sobre las raicillas de las semillas germinadas en el medio de Ingestad (23).

Cultivo de hongos comestibles

Es factible reproducirlos sobre residuos lignocelulósicos (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Volvariella*) o estiércol compostado (*Agaricus*).

Obtención del micelio

Cocer 1 kg de grano de trigo u otro cereal en 1,5 L agua durante unos veinte minutos, escurrir y mezclar con 3,5 g de carbonato de calcio y 13 g de yeso. Luego llenar frascos de boca ancha y esterilizar autoclave. Sembrar con un cultivo puro del hongo e incubar a 25°C hasta que todos los granos hayan sido invadidos por el hongo. Para mantener los granos separados se debe agitar los frascos con frecuencia. Luego mantenerlos en el refrigerador a 4°C, pero no más de un mes (19).

Para obtener el cultivo puro desinfectar a la llama la superficie del basidioma o ascoma y del interior tomar un trozo en condiciones de asepsia, depositarlo sobre agar malta y incubar a 25°C.

Cultivo de agárlicos

Compuesto

Contiene en volumen: paja húmeda 20 partes, estiércol equino o gallinaza húmeda (deyecciones de los pollos mezcladas con aserrín) 20 partes, yeso 1,25 partes.

* La primera etapa se lleva a cabo bajo un tinglado y consiste en:

día 1: Cortar y mojar la paja, hacer pilas de 60 cm de ancho y regarlas diariamente.

día 3: Mezclar con gallinaza regar sin que rebose el agua, acumular.

día 7: Mezclar bien, regar y apilar.

día 10: Formar un cúmulo de 180 cm ancho y 150 cm de alto, regar a fondo sin que rebose el agua.

día 14: Mezclar, agregar yeso y regar, amontonar.

día 17: Mezclar, regar, apilar.

día 20: Mezclar y regar, hacer un cúmulo de 150 cm de ancho.

día 22: Observar el compuesto, debe tener un color pardo oscuro uniforme, ser blando, friable y no desprender líquido al estrujarlo, sino continuar el proceso unos días más.

** Las acciones de la segunda etapa se realizan en un ambiente cerrado y son:

Colocar en cajones, en capas de 15 cm de altura. Apilarlos dejando huecos entre ellos para permitir el pasaje de los gases. Introducir vapor de agua a 60 - 70°C durante 6 - 10 horas. Dejar enfriar y ventilar. El producto no debe tener olor a amoníaco (20).

Siembra

Inocular los cajones con los granos invadidos por micelio de *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis* o *A. subrufescens*, mantener entre 21 y 25°C. Renovar el aire una o dos veces al día. Diez a 12 días ya colonizado todo el substrato, cubrir con una capa delgada de turba sin esterilizar mezclada con 1-2% de tiza (pH 7 - 7,5). Llevar la temperatura a 18°C y renovar el aire 2 a 3 veces por hora. Regar con frecuencia mediante un rociador de niebla sin empapar la cobertura. Cuando aparecen los primordios la temperatura debe estar entre 15 y 18°C (según la especie sembrada) y mantener la humedad del ambiente por encima del 70% (21, 22).

Cultivo de hongos lignívoros

Picar o moler paja de cereales, aserrín de maderas blandas, cáscara de maní, bagazo estacionado o mezcla. Mojar sin que rebose (70-80% de agua) y añadir 3-5% de yeso o 1-2% de tiza (pH 6 - 6,5). Apilar dejando huecos para permitir el pasaje de los gases. Introducir vapor de agua a 60 - 70°C durante 6 - 10 horas. Dejar enfriar y ventilar.

Mezclar el substrato con 1-4% de granos colonizados por el micelio de *Pleurotus ostreatus*, u otra especie, y llenar bolsas plásticas negras. Colocar las bolsas sobre alambres separadas unas de otras. Mantener la humedad relativa del local a 90%. Una vez que el micelio ha cubierto al substrato, quitar o perforar las bolsas con agujeros de unos 2 cm de diámetro, y exponer a la

luz. Ventilar y mantener la temperatura por debajo de 18°C y la humedad por sobre 70% (19).

Referencias

1. Samson RA *et al.*, eds. 1992. Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam. pp. 3, 11, 133, 341
2. Pitt JI, Hocking AD. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London, p 21, 59, 509.
3. Beuchat R, ed. 1987. Food and Beverage Mycology. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 66, 599.
4. Barnett HL, Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota, p 1.
5. Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI, Kew, Surrey. cap. 2.
6. Smith D, Onions AHS. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2ª ed. CAB International, Wallingford, Oxon, p 15, 87.
7. Skaar I, Stenwig H. 1996. Applied and Environmental Microbiology 62: 3614.
8. James TY *et al.* 2006. Mycologia 98: 860..
9. Collins CH *et al.* 1999. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 7º ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, p 137.
10. Dade HA, Gunnell J. 1969. Class work with fungi. 2ª ed. CAB, Kew, Surrey.
11. Andrews WH. 1995. Microbiological Methods. en: AOAC Official Methods of Analysis. Washington. p 11
12. Mueller GM *et al.* 2004. Biodiversity of Fungi. Elsevier, Amsterdam, p 595.
13. Déak T, Beuchat LR. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Ratón, pp 111, 152.
14. Jackson RM, Masson PA. 1984. Mycorrhiza. Edward Arnold, London.
15. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1992. La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Microbiológico de Control de los Alimentos. FAO, Roma.
16. Leveau JY, Bauix M. 2000. Microbiología Industrial. Acribia, Zaragoza, cap 3.
17. Samson RA *et al.* 1995. Introduction to Food-Borne Fungi. 4ª ed. CBS, Baarn, p 3
18. Downes FP, Ito K, eds. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA, Washington, pp 40, 217.

19. García Rollán M. 1998. Cultivo de Setas y Trufas. 3a ed. Madrid, Mundi-Prensa, pp. 49, 117.
20. Pacioni G. 1995. El Cultivo Moderno del Champiñón. De Vecchi, Barcelona, p 43.
21. Toovey FW. Cultivo de Champiñón. Acribia, Zaragoza, 1976, p.
22. Souza Dias E et al. 2013. Fungal Biology 117: 569-575.
23. Hall IR, Zambonelli A. 2012. En: Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. A Zambonelli & GM Bonito, eds. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, cap. 1
24. Volkart CM. 1964. Formación de micorrizas en pinos centroamericanos bajo condiciones controladas. Tesis. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica
25. Ingestad T, Kähr M. 1985. Physiol. Plant. 65:109-116
26. Longcore JE. 2004. Mycologia 96: 162-171.