

TESIS DOCTORAL

Evaluación de los hongos
contaminantes en obras de arte:
lienzos e imágenes talladas en madera

María del Mar Herrera Romero

DIRECTORA: D^a. ANA MARÍA MOLINA LÓPEZ

Córdoba, 2018

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE



TITULO: *EVALUACIÓN DE LOS HONGOS CONTAMINANTES EN OBRAS DE ARTE: LIENZOS E IMÁGENES TALLADAS EN MADERA*

AUTOR: *María del Mar Herrera Romero*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y
MEDICINA LEGAL Y FORENSE



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de los hongos contaminantes en obras de arte: lienzos e
imágenes talladas en madera**

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada
D^a. María del Mar Herrera Romero, para optar al Grado de Doctora por la
Universidad de Córdoba.

CÓRDOBA, 2018
V^o. B^o.
La Directora

Prof.^a D.^a Ana M^a Molina López



TÍTULO DE LA TESIS:

Evaluación de los hongos contaminantes en obras de arte: lienzos e imágenes talladas en madera

DOCTORANDA: María del Mar Herrera Romero

INFORME RAZONADO DEL LOS DIRECTOR DE LA TESIS

(Se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En primer lugar, la doctoranda, dentro de su especialidad, desarrolló los objetivos del trabajo, que consistieron en profundizar sobre las esporas de los hongos que contaminan lienzos e imágenes talladas en maderas. Para ello se utilizaron muestras de lienzos de cuadros y maderas de esculturas, en los procesos iniciales de restauraciones de dichas obras de arte

Se han utilizado numerosas técnicas experimentales tanto el microscopio óptico como electrónico, y de barrido en el Dpto. de Anatomía y Anatomía Comparadas, en el Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) y las modificaciones encontradas fueron cuantificadas con los correspondientes programas estadísticos.

Se destaca que con las conclusiones obtenidas se cubrieran las expectativas expuestas en los objetivos.

La publicación relacionada con dicha tesis está recogida en la revista científica Acta Microscópica y se denomina: *Caracterizaciones estructurales y ultraestructurales de los componentes granulares de Aspergillus niger y Penicillium candidum y la presencia de melanina en las fiálides*. Autores: MM Herrera, A Molina, A Blanco, C Blanco, JM Navas ISSN 0798-4545

Tanto el trabajo de redacción, como el de laboratorio los realizó el doctorando personalmente, y fueron supervisados conforme se llevaban a cabo.

Consideramos que el trabajo contiene todos los elementos de una investigación, con una metodología clara y se obtuvieron unos resultados muy aceptables.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 marzo de 2018

Firma de la directora

Profa. Dra. D.ª Ana M.ª Molina López

A mis padres, por haberme dado una infancia llena de felicidad y la mejor hermana, por haberme forjado como la persona que soy dándome ejemplos de generosidad y entrega porque, gracias a ellos, hoy puedo ver alcanzado mi objetivo, y por darme la lección más grande de vida que es la vida misma.

A mis tíos Dolores y Manolo, por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A Pedro y a nuestro proyecto en común más hermoso: Manuel.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso, sincero e incondicional, apoyo.

Agradecimientos

En primer lugar quiero mostrar mi más sentido agradecimiento a los miembros del departamento de “Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense” y al departamento de “Anatomía Patológica Comparada” de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba así como al Área de Microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) por haberme facilitado los medios e instalaciones necesarias.

Agradecimiento especial a la Dra. Dña. Ana Molina López, directora de esta tesis doctoral, ya que sin su orientación y apoyo esta tesis no hubiera sido posible, pues han sido muchas las consultas, muchos los correos y largas las jornadas de estudio y experimentación en que por mi falta de experiencia y, sobre todo por mis miedos, la he molestado y la he entorpecido en su quehacer personal y profesional, encontrándola siempre atenta, servicial y documentada maestra, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, así como permitirme el privilegio de trabajar junto a investigadores de reconocido prestigio y amplísima experiencia. Y un agradecimiento que hago extensivo a la Dra. M^a. Rosario Moyano Salvago, por darme la oportunidad de trabajar a su lado.

También un agradecimiento muy concreto a Maribel Barasona Carmona que ha colaborado generosa y muy satisfactoriamente en la mediación entre esta doctoranda y el equipo director allanando siempre los caminos y facilitando la resolución de cuestiones que desde mi óptica me parecían irresolubles. Y a José Miguel Navas Llorens por la realización de gestiones y el seguimiento del trabajo durante el proceso de su publicación.

Gracias a todos ellos por el apoyo recibido y por el afecto mostrado durante todos estos años.

Me gustaría resaltar con letras mayúsculas la importantísima labor del Profesor Emérito de la Universidad de Córdoba, el Dr. D. Alfonso Blanco Rodríguez, Doctor en Veterinaria y con un brillantísimo historial en la Universidad cordobesa como profesor (13 años) y catedrático (33 años) de Histología y Anatomía patológica dedicando su vida a la investigación a través del microscopio electrónico que lo ha dejado marcado como una autoridad indiscutible en la materia y un referente indiscutible y esencial para todos los doctorandos que encontramos en el estudio a través del microscopio la razón y el objetivo para nuestras tesis por su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo de investigación, así como por su implicación incondicional en el mismo, sin cuya colaboración esto no hubiera sido posible. Personalmente quiero agradecerle también su generosidad y paciencia al aguantarme horas y horas por mi obsesión perfeccionista, mis dudas y mi insistencia sabiendo que sus afirmaciones y sus teorías son siempre base científica a la que acogernos. Sin su capacidad investigadora, sin su ayuda permanente, sin su magisterio, sin su dirección a la hora de aventurarme en el uso del microscopio y sin su dedicación y ayuda jamás hubiera sido capaz de afrontar esta aventura que hoy es el objeto de mi tesis doctoral. Gracias Alfonso, has sido para mí más que un Maestro, un Director en la sombra que has completado con sabiduría, bondad y paciencia la gran labor de la dirección, en su aspecto más esencial del manejo del microscopio electrónico, de esta tesis en coordinación permanente con mi directora la Dra. D^a Ana Molina López. Siempre, esté donde esté, te

recordaré como el gran profesor y la mejor guía que jamás pude tener en el devenir de mi carrera en el aspecto concreto de la conservación de las obras que constituyen nuestro patrimonio cultural.

A Mari Carmen de la Paz Calatrava, siempre dispuesta a echar una mano, a abrirme caminos, a facilitarme encuentros en definitiva, que siendo generosa y amable me ha permitido un acercamiento al investigador que sin ella nunca me hubiera atrevido a afrontar. Gracias Mari Carmen y Alfonso, porque habéis sido pilares fundamentales y básicos de esta obra.

También me gustaría agradecer la colaboración del departamento de Restauración del Museo de Bellas Artes, de Sevilla que me ha permitido practicar y acercarme a aquellas figuras y obras que son el objeto de este trabajo de doctorado.

A mis padres, Manuel y Carmen, que me apoyaron en todos mis malos momentos y a la sabia ayuda incondicional de mi padre sin el cual yo no hubiera realizado este trabajo. Y a mi hermana que siempre me animó con alegría y me quiso llevar por el camino de la felicidad para alcanzar objetivos, siendo ella la alegría misma en mis momentos más difíciles.

Y sobre todo a Pedro y Manuel por soportarme diariamente, por sufrir mis ausencias, y por estar ahí siempre conmigo

Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Los hongos	2
1.1.1. Aspergillus.....	3
1.1.2. Aspergillus Níger.....	3
1.1.3. Penicillium.....	4
1.1.4. Los hongos radiotróficos.....	5
1.2. Juan de Valdés Leal	6
2.-OBJETIVOS.....	7
3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1. Prevención de aparición de hongos en lienzos de cuadros	12
3.2. Tipos de fibras usadas como soporte textil	13
3.3. Soportes pictóricos	13
3.4. Tejidos de las plantas traqueofitas:	14
3.4.1. Plantas vasculares (o traqueofitas) y no vasculares.....	14
3.4.1.1. Tejidos vasculares:.....	15
3.4.1.1.1. El Floema.....	15
3.4.1.1.2. El Xilema.....	17
3.5. Los hongos microscópicos	18
3.5.1. Estructura de los hongos.....	19
3.5.2. Reproducción de los hongos.....	20
3.5.3. Fisiología de los hongos.....	24
3.5.4. Utilización de los hongos.....	25
3.5.5. Clasificación de los hongos.....	26

Índice

3.6. Aspergillus Niger	27
3.6.1. Actividad metabólica y sus aplicaciones.....	27
3.6.2. Aplicaciones industriales.....	28
3.6.3. Patologías.....	28
3.7. Penicillium	30
3.7.1. Características generales.....	30
3.7.1.1. Descripción micológica.....	30
3.7.1.2. Reproducción.....	31
3.7.1.3. Microscopía.....	32
3.8. Melanina	32
3.8.1. El proceso de formación.....	32
3.8.2. En los humanos.....	33
3.8.3. En los animales.....	34
3.8.4. Apariencia.....	35
3.8.5. Hongos radiotróficos y melanina.....	36
3.8.6. Comparación con los hongos no melanizados.....	37
3.8.7. Importancia de la melanina en la naturaleza.....	39
3.8.8. Melanina en plantas.....	39
3.8.9. Síntesis de la melanina en hongos.....	40
3.9. Clasificación de las esporas	41
3.9.1. Por su función.....	42
3.9.2. Por su origen durante el ciclo biológico.....	42
3.9.3. Por la movilidad.....	42
3.9.4. Esporas de las plantas.....	42
4.-MATERIAL Y MÉTODOS	44
4.1. Grupos experimentales	44

Índice

4.2. Sabouraud glucosado agar	44
4.2.1. Fundamento.....	45
4.2.2. Siembra.....	45
4.2.3. Incubación.....	45
4.2.4. Resultados.....	46
4.2.5. Características del medio.....	46
4.3. Procedimientos de control de calidad	46
4.3.1. Realización del procedimiento de análisis.....	46
4.3.2. Control de calidad adicional.....	47
4.3.3. Resumen y explicación.....	48
4.3.4. Recogida y manipulación de las muestras.....	48
4.3.5. Aspergillus Níger, con cloranfenicol.....	49
4.3.5.1. Preparación.....	49
4.3.5.2. Control de calidad del medio.....	49
4.3.5.3. Siembra.....	50
4.3.6. Penicillium.....	51
4.3.6.1. Principios y explicación del procedimiento. Método microbiológico.....	51
4.3.6.2. Siembra.....	53
4.3.6.3. Incubación.....	53
4.3.7. Resultados.....	53
4.3.8. Características del medio.....	53
4.3.9. Almacenamiento.....	53
4.3.10. Fijación.....	54
4.3.11. Lavados.....	54
4.3.12. Aclaramiento.....	55

Índice

4.3.13. Infiltración.....	55
4.3.14. Inclusión.....	55
4.3.15. Microtomía.....	55
4.3.16. Tinciones.....	56
4.3.16.1. Técnica Tricrómico de Masson.....	56
4.3.16.2. Hematoxilina-eosina.....	57
4.3.16.3. Técnica del PAS.....	59
4.3.16.4. Azul de Metileno.....	60
4.3.17. Observación de resultados al microscopio electrónico.....	61
4.3.17.1. Microscopio Óptico(MO).....	62
4.3.17.2. Microscopio Electrónico de Barrido MEB) y de Transmisión(MET).....	62
4.3.18. Procedimientos morfométricos y estereológicos.....	62
4.3.19. Análisis estadístico.....	63
5.-RESULTADOS.....	64
5.1. Primer grupo. Cultivo de aspergillus Níger a los 5 días.....	65
5.2. Segundo grupo. Aspergillus cultivado durante 10 días.....	72
5.3. Tercer grupo. Penicillium.....	75
5.4. Cuarto grupo. Penicillium Cándidum de escultura.....	88
6.-ICONOGRAFÍA.....	92
7.-LEYENDAS DE LAS IMÁGENES	100
8.-DISCUSIÓN.....	103
8.1. Medios de cultivo para hongos.....	107
8.2. Uso de sustancias químicas para la recuperación de obras de arte.....	110
8.3. Descripción Penicillium spp.....	114
8.3.1. Descripción micológica.....	114
8.3.2. Hábitat.....	114

Índice

8.3.3. Reproducción.....	115
8.3.4. Características.....	115
8.3.5. Distribución y hábitat.....	116
8.3.6. Interacción con el ser humano.....	116
8.3.7. Control y prevención.....	117
8.4. Aspergillus.....	118
8.4.1. El Aspergillus niger.....	119
8.4.1.1. Aplicaciones industriales.....	121
8.4.1.2. Uso en alimentos.....	121
8.4.1.3. Aspergillus niger y salud.....	121
8.5. Síntesis de la melanina en hongos.....	123
8.5.1. Melanina en mamíferos.....	123
8.5.2. Importancia de las melaninas en la naturaleza.....	125
8.5.3. Comparación con los hongos no melanizados.....	126
8.5.4. Tipos de melaninas.....	129
8.6. Mohos perjudiciales.....	136
9.-CONCLUSIONES.....	139
10.- RESUMEN.....	141
11.- ABSTRACT.....	143
12.- BIBLIOGRAFÍA.....	145
13.-ANEXO.....	179

1.- Introducción

1. Introducción

El presente trabajo de investigación es fruto de una colaboración que se ha venido realizando durante muchos años entre el Servicio de Microscopia Electrónica del SCAI (Servicio Centralizado a la Ayuda de la Investigación) de la Universidad de Córdoba y la Directora de Restauración Dra. D^a. Fuensanta de la Paz Calatrava del Museo de Bellas Artes de Sevilla. En una primera instancia se realizó su trabajo de Tesina de Licenciatura y, posteriormente, su Tesis Doctoral, que obtuvo el Premio Extraordinario de Tesis Doctoral de la Universidad de Sevilla.

Dentro de los contaminantes biológicos que se encuentran en mayor cantidad en telas de cuadros, están los hongos microscópicos y pólenes. Por su carácter saprofito y parasitario, los hongos microscópicos, utilizan los componentes orgánicos de pinturas en las maderas y telas de los lienzos, para crecer y producir alteraciones que pueden llegar a su degradación. Esto se debe a que han estado normalmente en zonas desprotegidas y a veces a la intemperie, favoreciendo que fundamentalmente los hongos denominados “de la humedad” sean los que contaminen a las telas de los cuadros. Son muchos los hongos existentes que puedan realizar estos efectos, pero sin duda alguna los más numerosos son los *aspergillus niger* y *penicillium candidum*.

Introducción

En los casos de degradación de las telas de cuadros y maderas de las esculturas religiosas, por la acción de los hongos, resulta imprescindible realizar un diagnóstico y su posterior pronóstico. El microscopio electrónico de barrido (BEM) se convierte en un medio ideal para descubrir la presencia de los hongos, ya que las esporas y las hifas, se aprecian con estos microscopios. Pero estas identificaciones solo indican la presencia de los hongos contaminantes, pero no indican el tipo de hongo del que se trata, y lo que es más importante, tampoco indican si se encuentran potencialmente activos, por lo que resulta muy importante realizar su diagnóstico y conocer su viabilidad.

1.1. LOS HONGOS

Los hongos figuraban en las antiguas clasificaciones como una división del reino de las *Plantas*. Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que, en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento, habían perdido la clorofila, y con ello, su capacidad para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, en la actualidad los científicos los consideran un grupo completamente separado, que evolucionó a partir de flagelados sin pigmentos. Ambos grupos se incluyen dentro del reino *Protistas*, o bien se coloca a los hongos como un reino aparte, debido a la complejidad de su organización. Hay unas cien mil especies conocidas de hongos. Se cree que los grupos más complejos derivan de los tipos más primitivos, los cuales tienen células flageladas en alguna etapa de su ciclo vital.

Los hongos son un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. Hay hongos en cualquier parte en que existan otras formas de vida. Algunos son parásitos de organismos

Introducción

vivos y producen graves enfermedades en plantas y animales. La disciplina científica que estudia los hongos se llama micología.

1.1.1. El Aspergillus

El Aspergillus es un género de alrededor de 600 hongos (mohos), y es ubicuo. Los hongos se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas. El Aspergillus es un hongo filamentosos (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas). El hábitat natural del Aspergillus son el heno y el compostaje. Dentro del tipo de hifas se encuentra en las no pigmentadas que reciben el nombre de hialohifomicetos. A su vez tiene El Aspergillus dos formas de presentación: Una saprofítica en que aparece como un hongo con hifas septadas del que surgen los conidióforos que a su vez tienen una ampliación que es la cabeza aspergilar de la que surgen unas estructuras de forma ampular que son las fiálides, de las que surgirán las estructuras reproductivas (también llamados propágulos) que reciben el nombre de fialoconidias.

El hongo Aspergillus se caracteriza por estar formado por hifas septadas hialinas, y son uno de los contaminantes más habituales que existen. Las hifas fértiles o conidióforos terminan en una vesícula de la que surgen las células conidiógenas intermedias (métulas) o terminales (fiálides). De las fiálides salen las conidias (esporas asexuales externas) que forman largas cadenas. Por lo tanto, puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

Existen más de 600 especies de Aspergillus que se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (A. flavus), negro (A. niger), marrón (A. terreus). La coloración suele aparecer en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales.

1.1.2. Aspergillus Níger

Dentro del género Aspergillus, descubierto inicialmente por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, existen cientos de especies cuyo hábitat natural son el heno y el compostaje. El

Introducción

Aspergillus niger es un hongo filamentoso que produce un moho negro en varios vegetales, muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Curiosamente se encontraron sus esporas en la comida, en la ropa, en las flores y en viejas tumbas: del rey Casimiro de Polonia y en la momia y el sarcófago de Ramsés II.

El *aspergillus niger* se define por su coloración negra de su conidióforo y se debe a la presencia de melanina fundamentalmente en sus fialides. La melanina en el mundo animal se considera como una sustancia de protección, disponiéndose en las zonas más periféricas y externas. Diversos autores sugieren que la melanina favorece la virulencia de los agentes micóticos, y además los protegen de la respuesta de defensa del huésped, y de los agentes oxidantes, reduciendo la fagocitosis del hospedador.

1.1.3. El *Penicillium*

La primera descripción del género *Penicillium* en la literatura científica fue realizada por Johann Heinrich Friedrich Link en el año 1809. Link incluyó en su trabajo tres especies: *Penicillium candidum*, *P. expansum* y *P. glaucum*. John I. Pitt dividió el género en cuatro subgéneros en una monografía de 1979: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* y *Penicillium*.

En relación a la humedad, los *Penicillium* junto a los *aspergillus*, son los hongos más contaminantes.

El *Penicillium* es un género grande que puede encontrarse casi por todas partes, siendo el género de hongos más abundante en suelos. La fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema. Algunas especies producen toxinas, sin embargo muchas especies de *Penicillium* son beneficiosas para los seres humanos. Los quesos tales como el roquefort, brie, camembert, stilton, etc. se crean a partir de la acción de diferentes especies de *Penicillium* sobre la leche, y son absolutamente seguros de comer. El antibiótico penicilina es producida por el hongo *Penicillium chrysogenum*, un moho ambiental. Se caracterizan por formar conidios

Introducción

mediante una estructura ramificada que recuerda la forma de un pincel, las ramificaciones terminan en unas células que se conocen como fialides. Las fialides originan las esporas.

Los *Penicillium* son hongos filamentosos incoloros. Todas las especies del género *Penicillium* comparten una característica que hace que sean fáciles de reconocer. Su forma reproductiva asexual, los conidióforos, crecen formando un denso cepillo como un cojinetes. Los *penicillium* generan conidios, un tipo de spora caracterizada por formarse directamente en la hifa. El conidióforo, la parte vegetativa del cuerpo fructífero se ramificará dando lugar a la métula, un tipo celular intermedio. En el extremo de la métula aparece un tipo celular con forma de botella llamado fialide. La ramificación de los conidióforos, el número de métulas y fialides que aparecen en el extremo de cada conidióforo, se utiliza como carácter distintivo para la diferenciación de las especies del género. En el extremo de las fialides es donde crecerán las ascosporas, una o varias una encima de otras. Las esporas más pegadas a la fialide son las más jóvenes y las más alejadas son las más viejas y se acaban soltando para dispersar el hongo. Por lo general tan solo las esporas tienen color y éste es normalmente verde. No todas las especies del género sintetizan penicilina, aunque sí la mayoría.

1.1.4. **Los hongos radiotróficos**

Son hongos que aparentemente tienen la propiedad de hacer uso del pigmento melanina para convertir la radiación gamma en energía química que utilizan para su crecimiento

Este tipo de hongos fue descubierto por primera vez en 1991, donde apareció como un moho negro creciendo dentro y en las cercanías del reactor número 4 de la central nuclear de Chernóbil.

Estudios realizados en el Albert Einstein College of Medicine, mostraron que tres hongos que poseían abundante melanina, *Cladosporium sphaerospermum*, *Wangiella dermatitidis*,

Introducción

y *Cryptococcus neoformans*, aumentaron su biomasa y acumularon acetato más rápidamente en un ambiente en el que los niveles de radiación eran 500 veces mayores a los de un ambiente normal.

1.2. JUAN DE VALDÉS LEAL

Juan de Valdés Leal es, junto a Murillo, uno de los máximos representantes de la pintura barroca en España. Nació en 1622 en Sevilla. Era hijo del portugués Fernando de Nisa y de la sevillana Antonia de Valdés Leal. Se formó en Córdoba como discípulo de Antonio del Castillo y allí se casó, en 1647, con Isabel Martín de Morales. Dispuso de un taller en su casa, donde realizó sus primeras obras.

En 1649 Córdoba sufrió una epidemia de peste y Valdés Leal y su familia se trasladó a Sevilla. En este momento realiza un ciclo de pinturas para el convento de Santa Clara en Carmona entre las que destaca la *Retirada de los sarracenos*.

En *Las tentaciones de San Jerónimo*, el santo se dirige a su oratorio de manera fervorosa para rezar al crucificado, a la Biblia. La calavera está presente para que no olvide que como ser humano es mortal y efímero, y unas damas le provocan mostrándole las riquezas, la sensualidad, el lujo y los placeres, tentaciones que él no quiere ni contemplar.

Juan de Valdés Leal posee un estilo absolutamente barroco, de tendencia tenebrista. Le gusta lo dramático, decantándose por una temática macabra o grotesca. Su estilo es de gran expresividad, se interesa más por la expresión que por la belleza. Posee un vivo sentido del movimiento, un dibujo contundente, un colorido brillante y una dramática iluminación.

2.- Objetivos

2. Objetivos

Como **objetivos generales**, y una vez observados en los lienzos las esporas de los hongos microscópicos, pretendemos conocer:

- La viabilidad de los hongos contaminantes, tras realizar cultivos de las esporas en medios específicos para los hongos.
- Identificar los conidióforos de los hongos contaminantes.
- Conocer el papel que realiza la melanina como sustancia protectora de los hongos microscópicos.
- Conocer los hongos patólogos en los xilemas y floemas.

Y nos proponemos como **objetivos específicos** estudiar los aspectos morfológicos de los diferentes componentes de los conidióforos, en los lienzos de cuadros y maderas de estatuas.:

- Conocer la estructura y ultraestructura de los tallos.
- Conocer la estructura y ultraestructura de las vesículas.
- Conocer la estructura y ultraestructura de las métulas.
- Conocer la estructura y ultraestructura de los fiálides.
- Y conocer la estructura y ultraestructura de las esporas.

3.- Revisión Bibliográfica

3.Revisión Bibliográfica

Los hongos contaminantes representan un serio problema debido a que saprofitan con facilidad diversas muestras empleadas para diagnóstico (pus, sangre, expectoración, etc.), lo que genera confusiones en el análisis rutinario. Por otra parte, si bien es cierto que la mayoría de estos hongos son inoos, hay que tomar en cuenta que algunos de ellos, cuando crecen a temperaturas de 37 °C o más, tienen la capacidad de realizar cambios metabólicos y, por tanto, convertirse en agentes oportunistas, siempre que estén en contacto con un huésped propenso; por ejemplo, pacientes inmunocomprometidos por neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas), infección por virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (HIV/SIDA), trasplante de órganos, o bien debido al uso, cada vez más frecuente, de antibióticos de amplio espectro, inmunodepresores y citotóxicos (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). Así que es importante reconocer este tipo de hongos, ya que, en un determinado momento se pueden comportar como patógenos oportunistas, propiamente hablando.

Otro enfoque de los hongos contaminantes radica en que al ser ubicuos y transportarse (por esporas o conidios) a través del aire, actúan de una manera similar a los pólenes, es decir, como alérgenos; por tanto, suelen provocar cuadros de hipersensibilidad (alergias); de ahí que

Revisión Bibliográfica

resulte de vital importancia conocer la flora fúngica alergológica de todos los lugares y ciudades, la misma que varía según condiciones como temperatura, humedad, nutrientes, etc.; para ello es necesario hacer muestreos que determinen la presencia de este tipo de hongos en las diversas estaciones del año. El comportamiento de los hongos como alérgenos se explica en el capítulo correspondiente a aspergilosis, tomando como modelo a *Aspergillus* sp., el cual se puede extrapolar a cualquier tipo de hongo.

Los hongos desempeñan una serie de funciones claves en la vida. Es indudable su importancia ecológica por su capacidad para descomponer la materia orgánica y por su relación simbiótica con las plantas, ya que aumentan la superficie de absorción de las raíces. En biotecnología son utilizados por la industria para la fabricación de diferentes productos (vino, cerveza, pan, queso, antibióticos, solventes, condimentos y enzimas). En la alimentación son útiles como fuente de carbohidratos y minerales, y han sido empleados como alucinógenos en rituales por diferentes tribus. Lamentablemente, algunos hongos tienen capacidad patógena para el hombre, y no nos referimos a la toxicidad que presentan algunas especies, sino a la capacidad infecciosa de ciertas especies microscópicas (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). Estas especies son responsables de las micosis o infecciones fúngicas, cuya incidencia es desconocida al no ser enfermedades de declaración obligatoria. Las micosis pueden ser superficiales o externas, o bien profundas o sistémicas. **Las micosis superficiales o externas** son las que afectan a los tejidos queratinizados (capa córnea de la piel, pelos y uñas) y a las mucosas. Éstas son las más frecuentes y menos graves y se transmiten casi siempre por contacto con una persona infectada. Las más importantes por su frecuencia son las dermatofitosis, la pitiriasis versicolor y la candidiasis. **Las micosis profundas o sistémicas**, que afectan a los tejidos del interior del organismo, son las más graves y de difícil diagnóstico. La infección fúngica invasora es una de las complicaciones infecciosas de elevada mortalidad en pacientes inmunodeprimidos. Su frecuencia ha aumentado en los últimos años por el incremento

Revisión Bibliográfica

del uso de agentes inmunosupresores y quimioterápicos, por el aumento de la esperanza de vida de la población, que conlleva un aumento de la patología oncológica que precisa de estos agentes, y por el incremento del número de trasplantes. Cada vez se describen con mayor frecuencia infecciones causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos, incluidas algunas especies habitualmente saprofitas (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015) como consecuencia de mejores métodos diagnósticos y del empleo de tratamiento profiláctico con antifúngicos que desplaza al género *Cándida*.

Esta obra se ha centrado en las infecciones fúngicas invasoras y se encuentra dividida en cinco capítulos, en los que se presentan 121 imágenes, correspondientes a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., mucorales y hongos dematiáceos. Las levaduras del género *Candida* forman parte de la microbiota saprofita del aparato digestivo, piel, orofaringe y aparato genital. Los pacientes susceptibles o con factores de riesgo se pueden infectar por *Cándida* a partir de su propia microbiota (infección endógena). La transmisión exógena de *Cándida* es también posible en el contexto del enfermo crítico. Determinados factores han hecho que la incidencia de la candidiasis invasora haya aumentado de forma extraordinaria y que se encuentre en el 80% de las infecciones fúngicas invasoras (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Los avances médicos favorecen una mayor supervivencia, pero también estancias más prolongadas en el centro hospitalario, asociadas a una elevada mortalidad y costes económicos. Esto tiene una importante consecuencia: la colonización fúngica por *Cándida* está en razón directa del tiempo de estancia, la utilización de catéteres y la nutrición parenteral, los antibióticos de amplio espectro, los corticosteroides, los inmunosupresores, la hemodiálisis, la ventilación mecánica y el aumento de enfermos afectados de mayor edad. La candidiasis invasora es una enfermedad grave, progresiva y difícil de diagnosticar. Los síntomas clínicos son inespecíficos, de aparición tardía o no existen y, en un porcentaje alto de enfermos críticos, el diagnóstico es necrópico. La mortalidad atribuida a la candidiasis invasora puede ser hasta del

Revisión Bibliográfica

30%. Dentro del género *Cryptococcus* existen 19 especies conocidas. *C. neoformans* es la única referida como agente etiológico de criptococosis humana (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). Ésta es una levadura que pertenece a los basidiomicetos y está rodeada de una cápsula polisacárida considerada responsable de su virulencia. La criptococosis es una infección exógena, de distribución universal y de evolución subaguda o crónica, que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos, ya que se ha registrado hasta en un 13% de los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se adquiere por inhalación y se disemina por vía hematogena a diferentes órganos y tejidos. Inicialmente puede ser asintomática. La infección del sistema nervioso central es la más frecuente, si bien en ocasiones puede implicar a otros órganos. Aunque se reconoce la criptococosis cutánea primaria por inoculación, es obligatorio descartar siempre una infección sistémica

Los zigomicetos son un grupo de hongos filamentosos ubicuos en la naturaleza, normalmente saprofitos, responsables de micosis oportunista (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Las esporas permiten la diseminación del hongo en el aire, y así constituyen las partículas infectivas para el hombre. En la clase Zygomycetes tenemos: entomoftorales y mucorales. Los primeros son responsables de infecciones en individuos de áreas tropicales. Los mucorales (géneros *Rhizopus*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Mucor* y *Rhizomucor*) suelen afectar a pacientes con factores predisponentes (diabetes mellitus complicada con cetoacidosis, neoplasias, administración de corticosteroides o antibióticos de amplio espectro) capaces de causar infecciones de rápido desarrollo y, a veces, fulminantes en el paciente inmunodeprimido. Las diferentes formas de zigomicosis se clasifican según la localización anatómica implicada, siendo las más comunes la rinoorbitocerebral, en primer lugar, y la pulmonar, en segundo lugar.

La zigomicosis cutánea ha emergido como una forma principal en pacientes con alteraciones en la piel como barrera defensiva (cirugía, quemaduras, traumatismos, pinchazos, picaduras de insectos y otros tipos de lesiones cutáneas) o enfermedades de base; en ella, la

Revisión Bibliográfica

necrosis es el signo clave que debe alertar al clínico. La incidencia de zigomicosis parece haber aumentado, quizás a causa de un mayor número de pacientes con factores predisponentes y al mejor conocimiento de la entidad. Por su gravedad, la terapia se debe iniciar lo antes posible (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). Los hongos dematiáceos son hongos de distribución universal, saprofitos, que habitan en plantas y en la tierra. Se caracterizan por la producción de esporas resistentes a los cambios ambientales de temperatura, humedad, calor y desecación.

3.1. PREVENCIÓN DE APARICIÓN DE HONGOS EN LIENZOS DE CUADROS

Hay sitios en que no se dan tanto los hongos porque son lugares con clima más seco, pero en climas cálidos y húmedos puede pasar aun cuando no estén en una habitación húmeda.

Para prevenir los hongos se puede añadir a la pintura, cuando estemos pintando, un poco de líquido fungicida, también se pueden añadir insecticidas para todo tipo de insectos (carcoma, etc) Una vez pintado también se puede rociar con spray por todo el cuadro.

La clave para que no salgan hongos, está en almacenarlos de manera que circule el aire por los cuadros. Así que mejor es no apilar los cuadros por mucho tiempo o sea de vez en cuando tiene que darles la luz y el aire, porque si no el óleo también pierde color estando en la oscuridad, aunque si se saca a la luz, vuelve a recuperar el color.

Desde el punto de vista cronológico e histórico, hemos podido constatar que la historia del arte muy pocas veces ha hecho auténtico caso a cuestiones materiales y técnicas. Es cierto que hay una historia de las técnicas y en ella, también, se mencionan los distintos materiales pictóricos, pero casi nunca, por no decir nunca, se ha especificado y detallado la repercusión que tuvo la incorporación del lienzo en la manera de pintar de los artistas “europeos”, cuáles eran los gustos y preferencias de cada uno a la hora de escoger un tejido, su trama, etc. Queremos reflexionar sobre todo ello, en especial, sobre cuáles eran los lienzos más usados durante los

Revisión Bibliográfica

siglos XVI, XVII y XVIII. ¿Se utilizaban los mismos en cada época o fueron cambiando y evolucionando a medida que pasaban los años? ¿Realmente era el soporte ideal para los artistas?

3.2 TIPOS DE FIBRAS USADAS COMO SOPORTE TEXTIL

A lo largo de la historia, la pintura sobre lienzo ha sufrido una evolución morfológica y técnica que ha sido crucial para el desarrollo de la pintura. Verdaderamente, el soporte de tela supuso un cambio entre los pintores del final de la Edad Media y siglos posteriores, los cuales supieron cómo sacar el mejor partido de las telas para la ejecución de sus obras. Cabe decir que los primeros usos y funciones de las telas como soporte para la pintura fueron diversos a medida que iban evolucionando durante los siglos. Antes de emplearse las telas como soporte pictórico e incluso de la preparación de las pinturas sobre tabla en la Edad Media (S.XI-XV), descubrimos indicios sobre ellas muchos siglos antes, en el Antiguo Egipto (siglos I-III d.C), en los retratos de momias de Al Fayum (Comarca del Alto Egipto, al oeste del río Nilo). Sabiendo esta información, deducimos que los primeros usos del lienzo como soporte pictórico tuvieron una finalidad ritual funeraria.

3.3. SOPORTES PICTÓRICOS

Antes de entrar en profundidad en la definición de la tela y los tipos de fibras usadas como soporte textil, hemos de decir que el conocimiento de los materiales pictóricos, en particular el lienzo, es un campo del estudio de la pintura que nos hace ser conscientes del oficio del pintor.

Los materiales pictóricos son parte inherente de las obras que vayamos a estudiar, y aprender algo sobre ellos, siempre nos va a hacer entender mejor cualquier pintura. No obstante, desde el siglo XIX la producción industrial de estos materiales desvinculó al pintor de la elaboración de los mismos ya que, el comienzo del desarrollo industrial liberó al artista de tareas “indirectas” pero esenciales para su trabajo, a partir de entonces los aprendices al oficio no

Revisión Bibliográfica

tenían que recibir instrucción sobre los principios básicos, las propiedades y aplicaciones de los materiales, algo en lo que se había insistido tanto en el pasado.

El soporte es la base sobre la que se pinta. Cada soporte tiene sus propias características y el pintor debe conocerlas para saber las ventajas o inconvenientes de éstas. Queremos dejar constancia que el soporte en ningún caso se debe considerar como un material más, sino que adquiere una importancia tal, antes, durante y después de la realización de la obra, que lo hace merecedor de una especial atención por parte del artista, que deberá elegirlo siempre en función de la técnica que vaya a emplear y, por consiguiente, de los resultados que quiera conseguir con esa técnica.

La tela, según nuestro entender, podríamos definirla como la “parte oculta” de toda obra de arte, ya que generalmente, a simple vista no se observa claramente su composición, debido a que la pintura, por su anverso, se conforma de sucesivas capas antes de llegar a visualizarla, éstas son la capa de imprimación, la capa pictórica y el barniz. Aunque a grandes rasgos, definimos la tela como un tipo de tejido que se utiliza como soporte ‘móvil’ para las pinturas; es el soporte sobre el que, con previa preparación, se asienta la capa pictórica, por lo que cualquier alteración o problema la afectará directamente.

3.4. TEJIDOS DE LAS PLANTAS TRAQUEOFITAS

Volvamos ahora sobre los tejidos de las plantas traqueofitas:

3.4.1. Plantas vasculares y no vasculares

Las plantas se pueden dividir en dos grandes grupos, las **plantas vasculares o traqueofitas**, también conocidas como plantas superiores, y las **plantas no vasculares**. Las plantas no vasculares no tienen raíces ni tienen tejido vascular. Las traqueofitas, por el contrario, poseen raíces y tejidos conductores especializados en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos.

3.4.1.1. Tejidos vasculares:

Dentro de estos tejidos vasculares se diferencian dos tipos, **el floema y el xilema**, cada uno con una estructura diferente y una función específica. Se cree que aparecieron hace 450 millones de años y permitió que las plantas colonizaran hábitats terrestres.

Tanto el floema como el xilema tienen una estructura tubular y además del transporte de agua, minerales y nutrientes, también ofrecen soporte estructural y transportan señales químicas que permiten la comunicación entre distintas partes de la planta.

Juntos forman los haces vasculares (estelas) con diferente disposición entre diferentes partes de la planta y entre diferentes tipos de plantas. Generalmente el floema se sitúa en la parte externa de los haces vasculares y el xilema en la parte interna.

El proceso de formación de los haces vasculares se da en varios pasos. Primero se forma el protofloema y el protoxilema a partir del procámbium, un tejido del meristemo que aparece en el embrión y en los meristemos apicales de las plantas adultas. Después, a partir del cámbium fascicular, se forman el metaxilema y el metafloema, y posteriormente, si la planta tiene crecimiento secundario, se formarán el xilema y el floema secundarios a partir del cámbium vascular.

3.4.1.1.1. El Floema

El floema, también llamado tejido criboso, es el tejido conductor encargado del transporte de la conocida como savia elaborada, que está compuesta principalmente por agua, azúcares, minerales y otras sustancias orgánicas (hormonas, aminoácidos, etc).

El floema transporta savia elaborada (o savia orgánica, producto de la fotosíntesis, donde los nutrientes son convertidos en glucosa) y está localizada

Revisión Bibliográfica

en la capa más externa del tallo. Transporta savia elaborada de las partes clorofílicas, donde sucede la fotosíntesis, hasta las partes vivas de la planta, donde la glucosa será convertida en energía. Es formada por células vivas, alargadas y sin núcleo

La savia bruta, constituida por agua y sales minerales, es conducida por el xilema que lo realiza a partir de la capacidad de absorción por las raíces y distribución con destino esencial a las hojas. Su composición básica reúne elementos de vasos, elementos traqueales, traqueidas, fibras y células del parénquima.

La savia elaborada, formada por sustancias orgánicas producidas en la fotosíntesis, es transportada por el Floema partiendo de las hojas en dirección al resto de órganos, principalmente los de reserva energética (raíces y tallo).y formando una red por: elementos de tubos cribosos, células acompañantes, fibras y células de parénquimas.

El transporte en el floema se conoce como translocación y es multidireccional. Se produce por la presión hidrostática positiva creada por el gradiente de concentración de las sustancias orgánicas del interior del floema, principalmente los azúcares; de este modo el flujo se produce desde las fuentes de azúcares hacia las zonas de uso.

Durante los períodos de crecimiento, generalmente durante la primavera, los órganos de almacenamiento, por ejemplo las raíces, son fuente de azúcares que son transportados a través del floema hacia los meristemas de crecimiento. Cuando las hojas y partes fotosintéticas son la fuente de azúcares, el transporte se da en sentido contrario hacia los órganos de almacenamiento, como las raíces y frutos.

Revisión Bibliográfica

El floema consta de **dos tipos de células conductoras**: tubos cribosos, que son los elementos más característicos, y células anexas.

1. **Los tubos cribosos** son células alargadas con las paredes de los extremos perforadas por numerosos poros diminutos; a través de ellos pueden pasar las sustancias disueltas. Estos elementos están conectados en series verticales. Las células están vivas cuando llegan a la madurez, pero los núcleos se desintegran antes de iniciar la función conductora.

2. **Las células anexas**, más pequeñas, conservan los núcleos durante la madurez y también están vivas; se forman junto a los tubos cribosos y se cree que controlan el proceso de conducción.

3.4.1.1.2. El Xilema

El xilema es un tejido vegetal lignificado que se encarga del transporte de la llamada savia bruta, compuesta por agua y sales minerales provenientes de la raíz. La madera, principal tejido de soporte mecánico en la mayoría de plantas, está compuesta principalmente por xilema, motivo por el que también se conoce como leño, aunque está presente por toda la planta.

El transporte en el xilema, a diferencia del floema, es unidireccional y el movimiento se produce principalmente por presión negativa.

En relación a las maderas que se utilizan para esculpir, el xilema puede contener **tres tipos de células alargadas**: traqueidas, elementos vasculares o vasos (tráqueas) y fibras. En la madurez, cuando desempeñan funciones de transporte, todas estas células están muertas.

Revisión Bibliográfica

1. **Las traqueidas** son células alargadas con paredes gruesas caracterizadas por la presencia de zonas delgadas muy bien definidas llamadas punteaduras.

2. **Los elementos vasculares o vasos** son traqueidas especializadas cuyas paredes terminales están atravesadas por uno o varios poros; una serie vertical de elementos vasculares que forman un tubo continuo se llama vaso.

3. **Las fibras** son traqueidas especializadas de pared muy engrosada que apenas realizan funciones de transporte y que sirven para aumentar la resistencia mecánica del xilema.

3.5. LOS HONGOS MICROSCÓPICOS.

Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). Hay hongos en cualquier parte en que existan otras formas de vida. Algunos son parásitos de organismos vivos y producen graves enfermedades en plantas y animales. La disciplina científica que estudia los hongos se llama micología.

Los hongos figuraban en las antiguas clasificaciones como una división del reino Plantas. Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que, en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento, habían perdido la clorofila, y con ello, su capacidad para realizar la fotosíntesis (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Sin embargo, en la actualidad los científicos los consideran un grupo completamente separado, que evolucionó a partir de flagelados sin pigmentos. Ambos grupos se incluyen dentro

Revisión Bibliográfica

del reino Protistas, o bien se coloca a los hongos como un reino aparte, debido a la complejidad de su organización. Hay unas cien mil especies conocidas de hongos. Se cree que los grupos más complejos derivan de los tipos más primitivos, los cuales tienen células flageladas en alguna etapa de su ciclo vital.

3.5.1. Estructura de los hongos.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Y el conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de un hongo se llama micelio.

Las hifas son filamentos unicelulares que constituyen los cuerpos vegetativos de la mayoría de los hongos. Su crecimiento es tan rápido (hasta un milímetro por hora) que termina formando una maraña filamentosa de considerable espacio llamada micelio, como hemos adelantado.

Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos que pueden ser primarios o adventicios. Los septos primarios son los formados cuando hay división nuclear, mientras que los septos adventicios son independientes de la división nuclear relacionándose con el desplazamiento del protoplasma. En los septos primarios si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo. Los mohos son micromicetos filamentosos. Cuando el hongo es una célula aislada se dice unicelular o levadura. Los cortos filamentos compuestos por las células que brotan de una levadura constituyen el pseudomicelio.

Plecténquima es un conjunto de hifas entrelazadas que se asemejan a un tejido. Se dice **prosénquima** si las hifas pueden ser reconocidas y **pseudoparénquima** cuando han perdido su individualidad.

Esclerocio es un plecténquima generalmente macroscópico que puede permanecer en vida latente.

Revisión Bibliográfica

Rizomorfa es un cordón grueso donde el conjunto de las hifas fusionadas ha tomado el aspecto de raíz.

Rizoides son las hifas de succión, como raicillas, que penetran en el substrato.

Haustorio es la hifa de succión del hongo parásito dentro de la célula del hospedador.

Apresorios son unas hifas achatadas que se adhieren al substrato o al hospedador como sostén, especialmente en el comienzo de la infección.

En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). No obstante, hay un filo de hongos, que se asemejan a algas, cuyas hifas generalmente no tienen septos y los numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma.

Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos, tales como las setas y los pedos o cuescos de lobo. Otros tipos de enormes estructuras de hifas permiten a algunos hongos sobrevivir en condiciones difíciles o ampliar sus fuentes nutricionales. Las fibras, a modo de cuerdas, del micelio de la armilara color de miel (*Armillaria mellea*), facilitan la propagación de esta especie de un árbol a otro. Ciertos hongos forman masas de micelio resistentes, con forma más o menos esférica, llamadas esclerocios. Estos pueden ser de tamaño variado.

3.5.2. Reproducción de los hongos.

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar 12.000 millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el pedo o cuesco de lobo gigante puede producir varios billones.

Revisión Bibliográfica

Los hongos se multiplican por reproducción axesuada o sexuada. Estos dos estados reciben el nombre de Holomorfo. El holomorfo que indica, pues, el ciclo de vida total puede, pues, tener dos estados:

- **Anamorfo** es el hongo con multiplicación asexuada y
- **Teleomorfo** es el mismo con reproducción sexuada. Se les asigna distinto género y especie.

Las Esporas

Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas (Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd, 2014). Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos.

Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra.

Las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí.

Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas.

Las **basidiosporas**, por su parte, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios.

El otro proceso más común de producción de esporas implica la transformación de las hifas en numerosos segmentos cortos o en estructuras más complicadas de varios tipos.

Este proceso sucede sin la unión previa de dos núcleos. Los principales tipos de esporas reproductivas formadas así son: conidios y esporangiosporas. Estas últimas se originan en el

Revisión Bibliográfica

interior de unos receptáculos, parecidos a vesículas, llamados esporangios. La mayoría de los hongos producen esporas sexuales y asexuales

Las esporas son, pues, los elementos de perpetuación de la especie (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). De acuerdo a la morfología reciben distinto nombre:

- a) **Alantospora** con forma de banana
- b) **Aleuriospora** con base plana.
- c) **Dictiospora** con septos longitudinales y transversales
- d) **Didimospora** con un tabique
- e) **Esquinulada** como un erizo
- f) **Escolescospora** como un gusano
- g) **Estaurospora** como una estrella
- h) **Feospora** de color oscuro
- i) **Fragmospora** con tabiques transversales, fusiforme como un huso
- j) **Helicospora** como una espiral
- k) **Hialospora** de color claro y translúcido
- l) **Las hipnosporas** son aquéllas capaces de permanecer con vida latente por largo tiempo
- m) **Planospora** móvil
- n) **Verrucosa** con verrugas
- o) **Zoospora** con flagelos. Las balistosporas son proyectados violentamente una vez maduras

Las esporas por su origen pueden ser:

- a) De origen asexuado (**mitosporas**) y
- b) De origen sexuado (**meiosporas**)

Revisión Bibliográfica

Y por su ubicación relativa:

- a) **Internas**
- b) **Externas.**

Las mitosporas se originan en las estructuras anamórficas y

Las meiosporas en las teleomórficas.

Anamórficas Artrosporas o artroconidios son esporas desarrolladas en una hifa terminal que al madurar se separan. En algunos hongos se forman artrosporas separadas por una zona libre de citoplasma (disyuntor) cuya pared se rompe liberando las entosporas o clamido-artrosporas.

Clamidospora o clamidoconidio es una **hipnospora** o célula de resistencia, terminal o interhifal, con pared gruesa y sustancias de reserva.

Blastosporas o blastoconidios son las esporas que se originan de una parte de una célula somática, una hifa, un conidióforo u otra espóra, y se desarrollan antes de la formación del septo que lo separa de la célula de origen.

Conidios o conidiosporas son las esporas asexuadas externas. Si están implantadas directamente sobre la hifa se llaman sésiles. (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). La parte del micelio que origina y sostiene a las esporas se denomina esporóforo y si se trata de conidios se dice conidióforo.

Fiálide es la célula conidiógena que desde un extremo origina por brotación y sin aumentar su longitud, Los fialoconidios o fialosporas (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). La pared de la fiálide suele extenderse en el ápice formando un collarín.

Anélide es una célula conidiógena con el ápice ancho y cicatrices en anillo, que se alarga con la formación de cada espóra.

Revisión Bibliográfica

El **conidióforo**, que es una estructura microscópica especializada en la reproducción asexual de miles de esporas que son **los conidios** localizados en los extremos de las hifas, y pueden ser simples o ramificados y a veces están agrupados en un conidioma.

En **Penicillium** cada nivel de ramificaciones recibe distinto nombre, se llama **métulas** a las que sostienen a las **fiálides** productoras de esporas.

En **Aspergillus** las fiálides o las métulas están implantadas sobre una vesícula o dilatación del **esporóforo** (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002).

Los conidios, como hemos dicho anteriormente, nacen de los conidióforos aisladamente o quedan reunidos, ya sea en una cabezuela mucosa o en cadenas. Éstas se forman por **sucesión basípeta** cuando todas las esporas surgen de la célula conidiógena, o bien **basífuga** si es por brotación de la espora anterior.

A veces después que se forma un conidio, el conidióforo se alarga lateralmente y origina el segundo conidio. El proceso continúa y las esporas quedan en zig-zag (**proliferación simpodial**).

3.5.3. Fisiología de los hongos.

En la mayoría de los hongos las paredes de las hifas están compuestas principalmente por quitina y algunas hemicelulosas. La celulosa, que está presente solo en unos pocos grupos de hongos, es característica de los oomicetes (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). La proporción de agua de los hongos mucilaginosos generalmente es mayor del 90%.

Las esporas pueden tener menos del 50% de agua; otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos. Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. La mayoría de los hongos utilizan azúcares como la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Ciertas micorrizas toman directamente el nitrógeno de la

Revisión Bibliográfica

atmósfera; sin embargo, todos los demás hongos lo obtienen de nitratos, sales de amonio u otros compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Los hongos, además, precisan otros elementos como potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio; así como factores de crecimiento. Determinados hongos son deficitarios, al menos en parte, en uno o más factores de crecimiento.

3.5.4. Utilización de los hongos.

Las enzimas hidrolíticas de los hongos se utilizan en diversos procesos industriales. Cuando crecen sobre salvado caliente de trigo o de arroz, algunas especies fúngicas producen una amilasa que se usa en la fermentación alcohólica (Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd, 2014). Las proteasas que se obtienen de otros hongos se emplean en la fabricación de pegamento líquido. La producción industrial de alcohol etílico (etanol) se realiza por fermentación de melaza de caña de azúcar o de almidón hidrolizado mediante enzimas formadas por otros hongos. En el proceso de elaboración del pan se añade levadura a la masa para producir dióxido de carbono.

Cierto hongo, semejante a las levaduras, proporciona riboflavina; la biotina se acumula durante el proceso de producción de ácido fumárico por parte de otro hongo (Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd, 2014). También se utilizan organismos fúngicos en la elaboración del queso Roquefort, así como en la maduración del queso Camembert.

Los hongos se han utilizado en medicina desde tiempos remotos. El uso de hongos como purgantes ya no es tan común; sin embargo el alcaloide presente en el esclerocio del cornezuelo del centeno se emplea para conseguir contracciones uterinas durante el parto. De los alcaloides del cornezuelo se obtiene también la dietilamida del ácido lisérgico, más conocida como LSD, la cual provoca efectos alucinógenos.

Revisión Bibliográfica

La utilización de los antibióticos en la práctica médica comenzó cuando se descubrieron las propiedades antibióticas de la penicilina. Hoy se fabrican muchos antibióticos a partir de microorganismos que no son hongos.

3.5.5. Clasificación de los hongos.

A pesar de que en muchos textos se emplean sistemas de clasificación relativamente complicados, los micólogos utilizan por lo común un sistema sencillo, que tiene la ventaja de ser cómodo de usar. Según este sistema, los cuatro filos principales son:

Oomicetes (Oomycota),	Sus individuos forman oosporas
Zigomicetes (Zygomycota),	Sus individuos forman zigosporas
Ascomicetes (Ascomycota).	Sus individuos forman ascosporas
Basidiomicetes (Basidiomycota).	Sus individuos forman basidiosporas ,

(Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd, 2014)

Una gran variedad de especies se coloca, de forma arbitraria, en un quinto filo: **Deuteromicetes** (Deuteromycota), también llamados hongos imperfectos. Se incluyen en este grupo aquellos hongos en los que solo se conocen procesos de multiplicación vegetativa. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los ascomicetes.

Algunos otros filos se consideran hongos, o bien, grupos relacionados estrechamente con los hongos:

- Actinomicetes** (Actinomycota),
- Mixomicetes** (Myxomycota),
- Plasmodioforomicetes** (Plasmodiophoromycota),
- Labirintulomicetes** (Labyrinthulomycota) y
- Acrasiomicetes** (Acrasiomycota).

Los actinomicetes, con hifas muy delicadas y una reproducción que suele ser mediante oídios o conidios, constituyen un grupo intermedio entre las bacterias y los hongos.

Revisión Bibliográfica

A los **mixomicetes**, o mohos plasmodiales del fango verdaderos, algunos micólogos los clasifican con los hongos, y otros con los protistas semejantes a hongos (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). En este grupo la fase nutricional es una masa de protoplasma con forma ameboide carente de pared, denominada plasmodio. La fase reproductiva está representada por células nadadoras, llamadas células invasoras, las cuales se impulsan por medio de dos flagelos de distinta longitud.

Los plasmodioforomicetes se parecen a los mixomicetes en que ambos tienen células invasoras y un estado plasmodial.

Los labirintulomicetes y los acrasiomicetes tienen algunas características semejantes a los mohos plasmodiales del fango, pero su estado nutricional (llamado pseudoplasmodio) es diferente.

3.6. ASPERGILLUS NIGER.

Aspergillus niger P.E.L. van Tieghem, es el hongo filamentoso que produce un moho negro en varios vegetales, muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Curiosamente se encontraron sus esporas en la comida, en la ropa, en las flores y en viejas tumbas: del rey Casimiro de Polonia y en la momia y el sarcófago de Ramsés II.

Dentro del género *Aspergillus*, descubierto inicialmente por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, existen cientos de especies cuyo hábitat natural son el heno y el compostaje (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002).

3.6.1. Actividad metabólica y sus aplicaciones

De estudios en medios sólidos se ha observado que los valores promedio de la longitud y del diámetro de las hifas distales varían en relación inversa con la concentración inicial de glucosa. La red metabólica publicada para *Aspergillus niger*, está constituida por 1190 reacciones y 1045 metabolitos, distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial sin embargo, es realmente imposible poder medir simultáneamente a todas estas

Revisión Bibliográfica

especies o conocer en detalle el funcionamiento regulatorio de las diversas enzimas. Se cultiva para varios productos químicos: ácido cítrico, ácido glucónico, enzimas: glucoamilasa, galactosidasa, fitasa (*Aspergillus niger* var *ficuum*), glucosa oxidasa y lisozima.

3.6.2. Aplicaciones industriales

Produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). Se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de éste en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el medio líquido. En algunas industrias del mundo se alimenta el hongo con melazas o mieles de la industria del azúcar de caña y azúcar de remolacha. También se han estudiado otras alternativas como el almidón.

Se usa en la producción de ácido glucónico, en la fermentación del té (té chino llamado Pu-erh).

La producción industrial principal del *Aspergillus niger* está enfocada a la conservación de alimentos (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). Debido a que es un agente de fermentación, puede someterse a un proceso químico que lo hace un polvo que se usa en la conservación de alimentos. Al igual que el jugo de limón o de lima pueden evitar que una manzana o un aguacate se oscurezcan en presencia del oxígeno, el *Aspergillus niger*, que se encuentra en el jugo cítrico, puede ayudar a preservar la comida embotellada y enlatada.

3.6.3. Patologías

Es una especie inocua para los seres humanos y también para la mayoría de los cultivos. No causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en realidad es un hongo dañino para los humanos y animales en cantidades grandes, y benéfico en menores cantidades.

Revisión Bibliográfica

Puede causar que crezca moho negro en las plantas y, al igual que la mayoría de los mohos, causará enfermedades de pulmón si se inhala demasiado (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). El *Aspergillus niger* también puede causar graves infecciones del oído si muchas esporas de moho se alojan en el canal auditivo.

En altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en horticultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. La propagación rápida del *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de alergia.

La clasificación del *Aspergillus niger* es importante debido a que este hongo constituye una amenaza para la salud humana y animal. La correcta clasificación requiere conocimientos de micología, el estudio de los hongos, ya que hay cientos de especies de hongos *Aspergillus*. Hay varios métodos de identificación, con mayor disponibilidad a partir de la década del 2000 debido a los avances en biotecnología (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002).

La clasificación taxonómica, o jerárquica, del *Aspergillus niger* lo ubica como especie *Aspergillus niger*, del género *Aspergillus*, de la familia Trichomaceae, del orden Eurotiales, del phylum Ascomycota y perteneciente al reino Fungi. El género *Aspergillus* incluye más de 185 especies similares al *A. niger*.

El *Aspergillus niger* es un hongo común, versátil, de apariencia filamentosa y textura suave (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). El color es inicialmente blanco pero pronto se vuelve negro en la parte superior, mientras que la parte inferior permanece color amarillo pálido. El *Aspergillus niger* crece rápidamente, como la mayoría de las especies de *Aspergillus*. También existen características microscópicas distintivas de El *Aspergillus niger* que los micólogos pueden utilizar para clasificar una muestra.

Revisión Bibliográfica

El *Aspergillus niger* frecuentemente aparece luego de infecciones en el oído humano y a veces infecta los pulmones en personas que tienen su sistema inmunológico debilitado. La infección por *Aspergillus* (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999), también llamada aspergilosis, puede aparecer ocasionalmente en cualquier órgano o sistema de órganos del cuerpo humano. La correcta identificación de la infección, ya sea por *A. niger* o cualquier otro hongo invasor, es importante para determinar cómo tratarlo. El *Aspergillus niger* es tóxico al ingerirlo y las frutas, vegetales o granos infectados pueden producir intoxicación alimentaria si se ingiere en dosis únicas, o cáncer cuando el consumo es crónico. También algunas personas son alérgicas al *Aspergillus niger*.

3.7. PENICILLIUM

El *penicillium* es un género de hongos conocidos como mohos verdes o azules; de algunas especies del *penicillium* se obtiene la penicilina.

El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. 1985). Éstos son ramificados y en forma de abanico.

Los órganos sexuales son gametangios arrollados en hélice.

La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en *Penicillium notatum*, pero en la actualidad se obtiene de cepas de [*Penicillium chrysogenicum*] que dan mayor rendimiento. En los quesos azules, *Penicillium roqueforti* da sabor, y el color se debe a sus conidios.

3.7.1. Características generales

3.7.1.1. Descripción micológica

Revisión Bibliográfica

Hongo filamentoso que presenta conidióforos tabicados de pared lisa (200-300 μm), ramificado al final, con métulas (de 8-12 μm) y fiálides en forma de botella (de 7-12 μm), donde nacen conidios lisos, elipsoidales (de 2,5-4 μm) azules o verde-azulados en cadenas, sin ramificar, con un penacho o pincel característico (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). Colonias de crecimiento rápido, vellosas, aterciopeladas, verdosas con una corona radial ancha y blanca, a 25 C° (no crecen o crecen pobremente a 37 C°). Puede haber gotas de exudado sobre la superficie de la colonia. Reverso habitualmente amarillento o cremoso. Esporulación abundante. Olor aromático, especiado o afrutado (a manzana o a piña).

El *Penicillium* es un género grande y encontrado casi por todas partes, y siendo comúnmente el género de hongos más abundante en suelos, Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. (1985).

3.7.1.2. Reproducción

La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). Éstos son ramificados y en forma de abanico. Los órganos sexuales son gametangios arrollados en hélice.

Las colonias de *Penicillium candidum* son de crecimiento rápido, filamentosas y vellosas, lanosas o de textura algodonosa. Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. El reverso de la colonia es pálido o amarillento.

Penicillium candidum es termodimórfico y produce colonias filamentosas, lisas, con surcos radiales at 25°C (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). Estas colonias son azuladas - gris - verdosas en el centro y blancas en la

Revisión Bibliográfica

periferia. Un pigmento soluble rojo, rápidamente difusible al medio, observado desde el reverso es muy típico.

3.7.1.3. Microscopía

Las métulas son ramificaciones secundarias que se forman sobre los conidióforos. Las métulas acarrean fiálides en forma de frasco (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). La organización de las fiálides en la punta de los conidióforos es típica (llamadas "penicilli"o pincel). Las conidias (2.5-5 μ de diámetro) son redondas, unicelulares y observadas como cadenas no ramificadas en el extremo de las fiálides.

En su fase filamentosa, *Penicillium marneffe* es microscópicamente similar a otras especies de *Penicillium* (Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS Meor Hussin, 2016). En su fase de levadura, *Penicillium marneffe* presenta células globosas o elongadas con forma de salchicha (3-5 μ) que se multiplican por fisión.

3.8. MELANINA

La melanina es un pigmento que se halla en la mayor parte de los seres vivos. En los animales el pigmento se deriva del aminoácido tirosina. La forma más común de melanina es **la eumelanina**, un polímero negro-marrón de ácidos carboxílicos de dihidroxindol y sus formas reducidas (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999).

3.8.1. El proceso de formación

El proceso de formación de la melanina, se denomina melanogénesis, y se produce en el estrato más profundo de la epidermis (estrato basal) y en las células de la matriz del folículo pilosebáceo. La producción de melanina es estimulada por el daño en el ADN inducido por la radiación ultravioleta, (Hamilton AJ, BL Gomez, 2002). Las

Revisión Bibliográfica

propiedades químicas de la melanina la hace un fotoprotector muy eficiente. Absorbe la radiación ultravioleta nociva y transforma la energía en calor que resulta inofensivo a través de un proceso llamado «conversión interna ultrarrápida» Esta propiedad permite a la melanina disipar más del 99,9% de la radiación absorbida en calor. Esto previene el daño indirecto al ADN.

3.8.2. En los humanos

La melanina se encuentra en la piel, el pelo, en el epitelio pigmentado que rodea la retina, la médula espinal y la zona reticular de la glándula suprarrenal; en la estría vascularis del oído interno y en ciertas zonas profundas del núcleo del cerebro, como el locus coeruleus y la substantia nigra (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). La melanina es determinante en el color de la piel humana; en efecto si una persona se broncea por causa del sol, ese bronceado se va a producir de forma temporal pues con el tiempo la célula pierde la capa que le rodea (melanina bronceada) y la persona vuelve a obtener la feomelanina perdida que ha sido cambiada por la eumelanina bronceada y a recuperar su piel normal.

La melanina dérmica es producida por los melanocitos. Estos raramente se encuentran en las capas superficiales de la epidermis. Sin embargo, aunque generalmente todos los seres humanos poseen concentraciones similares de melanocitos en su piel, se producen variaciones en algunos individuos y según los diferentes grupos étnicos (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). En este último caso, la genética interfiere confiriendo una mayor o menor concentración de melanina en la piel. Algunos individuos, tanto en animales como en humanos, carecen de melanina, o bien tienen concentraciones mínimas de ella, lo que produce la condición conocida como albinismo.

Revisión Bibliográfica

Ya que la melanina está compuesta de moléculas pequeñas, existen muchos tipos de melanina (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). Tanto la feomelanina como la eumelanina sí se pueden encontrar en la piel y cabello humanos, pero la eumelanina es la más abundante de las melaninas en los humanos. También es la que más frecuentemente muestra deficiencias en el albinismo, aunque también hay albinismos por falta de feomelanina e incluso a veces de ambas melaninas.

Se piensa que la eumelanina es el principal agente protector para numerosas formas de vida en contra de la radiación ultravioleta, pero recientes estudios sugieren que este polímero podría tener distintas funciones para cada organismo. Por ejemplo, la inmunidad innata de los invertebrados frente a los patógenos invasores es influida principalmente por la melanina: a solo minutos de la infección, el microbio es encapsulado en melanina (mecanización); los radicales libres generados después de la formación de esta cápsula ayudan a su eliminación.

En la melanina es común encontrar en los polímeros numerosos enlaces cruzados: 5,6-dihidroxyndol (DHI) y 5,6-dihidroxyndol-2 ácido carboxílico (DHICA); esto ha sido descubierto en recientes investigaciones dentro de las propiedades eléctricas de la eumelanina. Sin embargo, esto ha indicado que tal vez existe otro mecanismo conformado por oligómeros básicos que se adhieren unos a otros.

3.8.3. En los animales

Los pigmentos de melanina son derivados del aminoácido tirosina. La forma más común de melanina biológica es la eumelanina, un polímero pardo-negro del ácido dihidroxindole carboxílico, y sus formas reducidas. Todas las melaninas son derivadas del poliacetileno (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). La melanina más común —dopamelanina— es un copolímero mixto de poliacetileno, polianilina y polipirrol. Otra forma común de melanina es la feomelanina, un polímero

Revisión Bibliográfica

rojo-pardo compuesto de unidades de benzotiazina responsable del cabello rojo y las pecas, negro o café, o bien la mezcla de sus copolímeros (Hamilton AJ, BL Gomez, 2002). La forma más común de melanina orgánica es un polímero, conformado por indolequinina o dehidroxindolina ácido carboxílico, ya sea combinados o en cadena. La melanina existe en el reino vegetal, animal y en el protista, donde sirve de pigmento.

La presencia de melanina en los reinos Archaea y Bacteria sigue siendo motivo de debate entre los investigadores del área. El incremento de la producción de melanina en la piel humana es llamado melanogénesis. El daño inducido en el ADN por la radiación UV, estimula la producción de melanina, y esto lleva desarrollar el bronceado de la piel. El bronceado basado en la melanogénesis toma tiempo para lograrse, pero es más duradero.

3.8.4. Apariencia.

Su color es negro, no refráctil, granular, teniendo los gránulos un diámetro aproximado de menos de 800 nanómetros. Esta característica es lo que diferencia a la melanina de otros pigmentos contenidos en la sangre, que se encuentran en trozos más grandes y son refráctiles, en un rango de color del verde al amarillo así como el café rojizo (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). En lesiones altamente pigmentadas, se pueden encontrar agregado de melanina que pueden oscurecer el detalle histológico. Una solución de permanganato de potasio es un efectivo agente decolorante de la melanina.

La melanina es un biopolímero y un neuropéptido. Las melaninas son estructuras rígidas de polímeros conductores compuestos de poliacetileno, polipirrol, y polianilina «negros» y sus polímeros mezclados (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). La melanina más simple es el poliacetileno, del cual derivan todos los demás, algunas melaninas fungales son poliacetileno puro.

Revisión Bibliográfica

Estos descubrimientos estuvieron perdidos hasta el resurgimiento reciente de melaninas usadas en dispositivos, particularmente en displays electroluminiscentes. En el año 2000, el premio Nobel de química fue obtenido por tres científicos por el subsecuente (re)descubrimiento y el desarrollo de dichos polímeros conductores orgánicos (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). Al parecer el Comité del premio Nobel no tenía ninguna evidencia del reporte casi idéntico que Weiss registró en 1977 sobre la alta conductividad pasiva en el polipirrol, ni de las propiedades de alta conductividad de la melanina DOPA y sus semiconductores similares. El dispositivo electrónico orgánico de melanina es exhibido en estos días en el Museo Nacional de la Historia Americana de la Institución Smithsonian, en su sala Smithsonian Chips que cuenta con una colección de dispositivos electrónicos históricos.

El proceso de síntesis de la melanina por los melanocitos se produce en el interior de los melanosomas a partir de la tirosina. Una serie de oxidaciones de la tirosina llevan a la constitución de dihidroxifenilalanina (DOPA), lo que origina la producción de dopaquinona. Esto lleva a la formación de eumelaninas y feomelaninas.

Es decir, que los diferentes tipos de melanina se forman a partir de la tirosina.

Las dos funciones principales de la melanina en nuestro cuerpo son ofrecer una protección natural frente al sol y dotar de distinto color y tonalidades a la piel y el cabello, lo que depende de la calidad y cantidad de melanina en el organismo y de factores genéticos.

3.8.5. Hongos radiotróficos y melanina.

Los hongos radiotróficos son hongos que aparentemente hacen uso del pigmento melanina para convertir la radiación gamma en energía química que utilizan para su crecimiento (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). Este mecanismo propuesto podría ser similar al de fijación del carbono en los organismos fotótrofos, los cuales

Revisión Bibliográfica

capturan fotones de la luz visible por medio de pigmentos como la clorofila, para luego utilizar su energía en la generación de ATP y poder reductor desembocando finalmente en la fotólisis del agua. Sin embargo, aún se desconoce si los hongos que contienen melanina emplean una ruta metabólica de múltiples pasos similar a la de la fotosíntesis, o algún tipo de ruta de quimiosíntesis.

Este tipo de hongos fueron descubiertos por primera vez en 1991, donde aparecieron como un moho negro creciendo dentro y en las cercanías del reactor número 4 de la central nuclear de Chernóbil. Estudios realizados en el Albert Einstein College of Medicine mostraron que tres hongos con melanina, *Cladosporium sphaerospermum*, *Wangiella dermatitidis*, y *Cryptococcus neoformans*, aumentaron su biomasa y acumularon acetato más rápidamente en un ambiente en el que los niveles de radiación eran 500 veces mayores a los de un ambiente normal, (Jacobson ES, 2000) La exposición de células de *C. neoformans* a estos niveles de radiación, alteró rápidamente (dentro de los 20–40 minutos de la exposición) las propiedades químicas de su melanina y aumentó entre tres y cuatro veces las tasas de transferencia de electrones mediadas por la melanina (medida como la reducción de ferricianuro por el NADH) al ser comparadas con células no expuestas. Los autores observaron efectos similares en la capacidad de transporte de electrones de estos hongos luego de exponerlos a radiación no ionizante, sugiriendo que los hongos melanóticos también podrían ser capaces de usar luz o radiación calórica para su crecimiento.

3.8.6. Comparación con los hongos no melanizados

La melanización, por otro lado, tiene un coste metabólico elevado para las células fúngicas; en ausencia de radiación, algunos hongos sin melanina (que habían sufrido mutaciones en la vía de biosíntesis de melanina) crecieron a mucha más velocidad que sus equivalentes melanizados. Se ha sugerido que la presencia de

Revisión Bibliográfica

moléculas de melanina en la pared celular de los hongos podría limitar la incorporación de nutrientes, o que se podrían formar compuestos intermediarios tóxicos para la célula durante la síntesis de melanina, lo que contribuiría a la observación de este fenómeno (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). Esto es consistente con la observación de que a pesar de que muchos hongos son capaces de producir melanina, no lo hacen constitutivamente (es decir durante todo el tiempo), sino que lo hacen en respuesta a un estímulo externo durante diferentes etapas de su desarrollo.

El proceso bioquímico exacto por el cual se produciría la síntesis de compuestos orgánicos mediada por la melanina, como se ha sugerido para el crecimiento de estos hongos; incluyendo los intermediarios químicos (tales como moléculas dadoras electrónicas y aceptores electrónicas nativas) y productos químicos, aún es desconocido.

La melanina también funciona como sistema de evasión de los mecanismos inmunológicos del huésped. Se sabe que la melanina de la uva tiene propiedades inmunomoduladoras, principalmente en la disminución de las citocinas de tipo proinflamatorias (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). Otras observaciones sugieren que la melanina contribuye a la virulencia de los agentes micóticos, protegiéndolos de la respuesta de defensa del huésped, pueden activar la cascada del complemento, protegerlos frente a agentes oxidantes, reducir la fagocitosis o la inducción de la muerte celular, inducir una fuerte respuesta de anticuerpos y generar disminución en la absorción de ciertos medicamentos en los tejidos del huésped, representada por la resistencia o la disminución de la sensibilidad a los compuestos antimicrobianos, como son la anfotericina B y la caspofungina.

El estudio de estas propiedades de la melanina no sólo se ha llevado a cabo in vitro o con cepas mutantes, sino también con modelos animales en ratones; así se sabe

Revisión Bibliográfica

que los ratones son susceptibles a un amplio rango de infecciones microbianas como los humanos. Esto ha hecho de ellos un buen modelo para generar infecciones que simulen lo que ocurre en los humanos (Jacobson ES. 2000); a pesar de las muchas diferencias entre ambos, el sistema inmune del ratón y el del humano son muy similares y ambos están formados por los componentes: la respuesta innata, la cual actúan mediatamente contra los microorganismos, y la respuesta adaptativa, a cual genera memoria inmunológica.

3.8.7. Importancia de la melanina en la naturaleza

En las plantas la melanina es de tipo DNH-melanina y hace parte de los metabolitos secundarios; una gran variedad de funciones se han asociado con la melanina; puede servir como transmisora de energía, unir medicamentos y químicos, y afectar la integridad celular. Las melaninas también son usadas como camuflaje y para manifestaciones sexuales (Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes, 1999). La tinta de *Sepia officinalis* es una suspensión de partículas de melanina que ha mostrado tener actividad antiviral in vitro, contra el virus de la inmunodeficiencia humana y puede inhibir la formación de sincitios o efectos citopáticos producidos por los virus. Los insectos generan una respuesta inmune contra la melanina expresada por los microorganismos invasores. En general, la melanina ha sido involucrada en muchos procesos fisiológicos, fisiopatológicos y patogénicos. En la actualidad se ha reportado la producción de melanina por muchos microorganismos, tanto ambientales como patógenos para plantas y animales.

3.8.8. Melanina en plantas

Los pigmentos de origen vegetal, desde rojos y cafés hasta negros, generalmente se producen por sustancias no nitrogenadas (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). Estas sustancias en las plantas se denominan alomelaninas o melaninas DHN,

Revisión Bibliográfica

por su precursor el dihidroxinaftaleno. Hasta la fecha, las melaninas de las plantas no han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, se conoce que *Sarothamnus scoparius* (retama) es una de las plantas con mayor contenido de melanógenos; de las legumbres y frutas es posible aislar tirosina, DOPA, tiramina, dopamina y epinefrina (N-metildopamina), el color ennegrecido de los tubérculos (papas), las frutas (manzanas, etc.) y en plantas como *Vicia faba* (habas) se encuentra alta gran cantidad de DOPA, siendo éste un proceso de melanogénesis de tirosinasa o DOPA, (Jacobson ES. ,2000). En todas las plantas las polifenoloxidasas son muy comunes, pero no siempre terminan en la formación de melanina; por ejemplo, el proceso de maduración del banano está relacionado con la dopamina. Aunque la melanina se localiza en un solo tejido de la planta, las enzimas que participan en su síntesis están distribuidas en varias partes de la planta.

Las melaninas son pigmentos oscuros que protegen los organismos contra el estrés ambiental; así mismo, algunos fitopatógenos requieren de la melanización en los apresorios para invadir los tejidos del huésped. En muchos hongos, fitopatógenos como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, el agente etiológico de la enfermedad devastadora de las raíces de los cereales (devastating root disease of cereals), requieren de la producción de melanina para causar enfermedad. Muchos de estos estudios muestran que la melanina puede jugar un papel crucial en la virulencia de los patógenos para las plantas, en la penetración.

3.8.9. Síntesis de la melanina en hongos

En ciertos hongos, el conidióforo es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). Se localizan en el extremo de hifas las cuales levantan la conidiófora en el aire con el fin de esparcir las esporas

Revisión Bibliográfica

con más eficiencia. Algunas conidióforas (en el *Geotrichum candidum*, por ejemplo) son de un filamento, mientras que otras (en el *Trichoderma viride*, por ejemplo) son ramificadas.

El gametófito es el individuo de la generación haploide en las plantas con ciclo de vida haplo-diplonte (es decir, con generaciones alternadas de individuos haploides y diploides). El gametófito es descendiente de un individuo adulto fértil de la generación diploide (llamado esporófito), y a su vez tendrá descendientes directos que también serán diploides (esporofitos).

El gametófito es en un principio una única célula haploide originada por meiosis en el esporofito (el individuo adulto diploide multicelular), pero a diferencia de lo que pasa con los animales por ejemplo, esta célula haploide posteriormente se desarrolla por mitosis, dando un individuo adulto multicelular (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). Es este adulto multicelular el que dará los gametos fértiles que se unirán durante la fecundación, dando un nuevo individuo diploide.

El gametófito produce los gametos masculinos o femeninos (o ambos). No hay cambio de número de cromosomas en el gameto, que tiene la misma cantidad haploide de cromosomas que el gametófito y por lo tanto en este caso los gametos son producidos por mitosis (esto es una diferencia con lo que pasa en el ciclo de vida diplonte que poseen los animales, por ejemplo). La fusión de los gametos masculinos y femeninos produce el cigoto diploide.

3.9. CLASIFICACIÓN DE LAS ESPORAS

Las esporas se pueden clasificar según su función, estructura, origen del ciclo vital o por su movilidad:

Revisión Bibliográfica

3.9.1. Por su función.

Las diásporas son unidades de dispersión de los hongos, musgos y algunas otras plantas. En hongos, las clamidosporas son esporas multicelulares de pared gruesa resultado de reproducción asexual y las zygosporas son la parte sexual pues se dividen por meiosis cuando logra condiciones para germinar. Los hipnozigos de los hongos zigomicetos son producidos por vía sexual y pueden dar lugar a una conidiospora (“zygosporangium”) asexual.

3.9.2. Por su origen durante el ciclo biológico.

Una meiospora es el producto de la meiosis (la etapa citogenética crítica de la reproducción sexual), lo que significa que es haploide y que dará lugar a una célula o individuo haploide. Esto es característico en los ciclos vitales de plantas y algas.

Una mitospora se produce por un mecanismo de esporulación y se propaga por un medio asexual como resultado de la mitosis. La mayoría de los hongos producen mitoesporas.

3.9.3. Por la movilidad.

La movilidad es la capacidad de moverse autónoma y espontáneamente. Las esporas se dividen según puedan moverse o no (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). La zoospora puede moverse por medio de uno o más flagelos y se pueden encontrar en algunas algas y hongos. En tanto la autoespora no puede moverse y no tiene el potencial de desarrollar ningún flagelo. Las balistosporas se descargan activamente del cuerpo fructífero. La estatismospora no se descarga activamente del cuerpo fructífero, como en el pedo de lobo.

3.9.4. Esporas de las plantas

Esporas producidas en un ciclo de vida vegetal, donde hay alternancia haplonte (n) - diplonte (2n).

Revisión Bibliográfica

Las plantas se caracterizan por tener un ciclo vital con alternancia de generaciones, una generación esporofítica y una gametofítica (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007).

Ciertas células de los esporofitos producen esporas haploides por meiosis.

En el caso de las plantas vasculares como los helechos, la dispersión anemócora proporciona una gran capacidad de distribución de las esporas (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). También, las esporas son menos propicias para la depredación animal que las semillas porque no contienen casi ninguna reserva de alimento, pero son más propicias para la depredación por hongos y bacterias. Su principal ventaja es que, de todas las formas de reproducción, las esporas requieren menos energía y materiales para producirse. Las esporas de las plantas vasculares son siempre haploides, pudiendo ser isosporas (homosporas) o heterosporas. Las heterosporas, presentes por ejemplo en las selaginellas, isoetes y algunos helechos acuáticos, producen esporas de dos tamaños: las esporas más grandes (megasporas) producen gametófitos femeninos y las más pequeñas (microsporas) producen gametófitos masculinos. Las esporas pueden ser de dos tipos atendiendo a las marcas de desarrollo: monoletas o triletas. En las monoletas, hay una sola línea elevada en la espóra que indica el eje a lo largo del cual la célula madre de las esporas se dividió (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). En las esporas triletas, las cuatro esporas comparten un origen común, se disponen según un tetraedro y entran en contacto en tres caras separadas por tres carenas que irradian de un punto central.

4.- Material y Métodos

4.- Material y Métodos

4. Material y Métodos

Como material de estudio se han utilizado hongos procedentes de lienzos de cuadros y maderas de esculturas, en los procesos iniciales de restauraciones de dichas obras de arte.

4.1. GRUPOS EXPERIMENTALES:

- Primer grupo. Cultivo de *aspergillus niger* a los 5 días en lienzos.
- Segundo grupo. Cultivo de *aspergillus niger* a los 10 días en lienzos.
- Tercer grupo. Cultivo de *penincilium candidum* a los 10 días en lienzos.
- Cuarto grupo. Cultivos de *aspergillus niger* y *penincilium candidum* a los 10 días en esculturas.

4.2. SABOURAUD GLUCOSADO AGAR

Los hongos obtenidos se cultivaron en agar Sabouraud glucosado.

El agar Sabouraud es un medio de cultivo que por sus características funciona como medio de enriquecimiento para hongos y que en caso de contener cloranfenicol u otro antibiótico, se convierte en un medio selectivo para los mismos. El medio contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos sobre las

Material y métodos

bacterias. Es utilizado para el cultivo de hongos, especialmente dermatofitos, aunque también pueden desarrollarse en él cierto tipo de bacterias filamentosas tales como Nocardia.

Fue utilizado por primera vez por Raymond Sabouraud en 1892. Más tarde Chester W. Emmons mejoró el medio acercando el pH al neutro (pH entre 5,5 y 6,0) y disminuyendo el nivel de glucosa para permitir el crecimiento de otros subcultivos de hongos.

Sabouraud Glucosado Agar es un medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

4.2.1. Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc.). En el medio de cultivo, la pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos sobre el de bacterias.

Además, al medio de cultivo pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

4.2.2. Siembra

Depende del uso y puede ser tanto en tubo como en placa.

4.2.3. Incubación

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Material y métodos

4.2.4. Resultados

Microorganismos	Crecimiento
Saccharomyces cerevisiae	Bueno
Aspergillus niger	Bueno
Candida albicans ATCC 10231	Bueno

4.2.5. Características del medio.

Medio preparado: Ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.

Almacenamiento: Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Para este estudio se utilizaron como métodos de detección de Aspergillus, por un lado, el test **PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag** (Ref 62794, BIO-RAD; USA) según las indicaciones del fabricante; por otro lado, se realizó diagnóstico molecular de DNA genómico con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCRrt), utilizando el suero ASPERGILLUS SSP Q-PCR ALERT AMPLIPROBE (Ref RTS110-P, NANOGEN; Italy) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo SmartCyclerR (Myconostica; UK)

Aspergillus: BBL Sabouraud Dextrose Agar Y BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol L007492 • Rev. 12 • Octubre 2015

4.3. PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

El Sabouraud Dextrose Agar (agar dextrosa Sabouraud) es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. Se logra selectividad mediante la adición de cloranfenicol.

4.3.1. Realización del procedimiento de análisis

1. **Licuar** Sabouraud Dextrose Agar Deeps en tubos A mediante ebullición en baño María.* Enfriar a 45 – 50 °C y verter en placas de Petri y dejar solidificar durante, como mínimo, 30 min. *NOTA: No se recomienda utilizar un horno de microondas.

Material y métodos

2. **Inocular** muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.

a) **Extender** en la superficie de agar 0,01 mL de asa calibrada utilizando cultivos de caldo fúngicos (hasta 7 días de antigüedad). Para *Escherichiacoli*, inocular un asa llena utilizando un cultivo de caldo de soja Trypticase de 18 a 24 h diluido en proporción 10-1

b) **Incubar** los recipientes de prueba a 25 – 30 °C en una atmósfera aerobia. Las tapas deben estar flojas en los medios en los tubos y frascos.

c) **Incluir** agares inclinados de Sabouraud Dextrose Agar en calidad de controles no selectivos cuando se analice Sabouraud Dextrose Agar con medios con cloranfenicol.

**NOTA: Trabajar con A. brasiliensis (ATCC 16404) en una cabina de seguridad biológica.*

3. **Examinar** los recipientes durante un máximo de 7 días para ver si presentan crecimiento y pigmentación y en busca de selectividad en el medio con cloranfenicol.

4. **Resultados previstos** Para Sabouraud Dextrose Agar Organismos de control CLSI (cepas ATCC) **Candida albicans* (60193)..... Crecimiento a las 72 h

4.3.2. Control de calidad adicional

1. Examinar los tubos o frascos como se describe en la sección “Deterioro del producto”.

2. Examinar visualmente los tubos o frascos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.

3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $5,6 \pm 0,2$. 4. Incubar tubos o frascos

Material y métodos

representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

4.3.3. Resumen y explicación

Sabouraud Dextrose Agar es un medio de propósito general diseñado por Sabouraud para el cultivo de dermatofitos. Un bajo pH (de 5,6 aproximadamente) favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitorio para las bacterias contaminantes en muestras clínicas. La adición de cloranfenicol es una modificación diseñada para aumentar la inhibición bacteriana y posibilitar el aislamiento de muestras contaminadas de hongos oportunistas que causan infecciones clínicas similares a la dermatofitosis pero sensibles a la cicloheximida incluida en algunos medios fúngicos selectivos.

4.3.4. Recogida y manipulación de las muestras

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

Los agares inclinados en tubo preparados están diseñados para uso con cultivos puros con fines de mantenimiento y otros propósitos. Los medios pueden inocularse hasta la fecha de caducidad e incubarse durante un máximo de 6 semanas. Para el aislamiento de hongos de muestras potencialmente contaminadas, se debe inocular un medio selectivo junto con uno no selectivo. Incubar los recipientes a 25 – 30 °C con mayor humedad. Todos los cultivos deben examinarse al menos una vez por semana para ver si presentan crecimiento fúngico y deben mantenerse durante 4 – 6 semanas antes de ser interpretados como negativos.

Material y métodos

Después de una incubación suficiente, los recipientes deben mostrar colonias aisladas en áreas extendidas y crecimiento confluyente en áreas de inoculación densa. Puede ser necesario transferir el crecimiento de los agares inclinados a medios en placa para obtener cultivos puros de hongos. Examinar los recipientes para ver si presentan colonias de hongos con morfología típica microscópica y de colonias. Las pruebas bioquímicas y procedimientos serológicos deben realizarse para confirmar los hallazgos.

4.3.5. Aspergillus Níger, con cloranfenicol.

- Polipeptona micológica 10,00 g
- Dextrosa 40,00g
- Cloranfenicol 0,50g
- Agar-agar 15,00g

(Fórmula por litro) pH final: $5,6 \pm 0,2$

4.3.5.1. Preparación

Disolver 65,5 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición, agitando para su completa disolución. Repartir en tubos o frascos. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos, o mejor 116 °C durante 10 minutos evitando el sobrecalentamiento.

4.3.5.2. Control de calidad del medio

El control de calidad de un producto debe realizarse en un laboratorio siempre que varíen las condiciones de uso y que éste supere los tres meses sin usarse o adquiera aspectos extraños aunque no hubiese alcanzado la fecha de caducidad teórica de la etiqueta.

Siguiendo los siguientes pasos:

DESHIDRATADO: Polvo grueso, Crema PREPARADO: Estéril, Crema

Material y métodos

CONTROL DE CRECIMIENTO CUANTITATIVO 3-5 días a temperatura ambiente (21-28°C aproximadamente):

Staphylococcus aureus MKTA 6538P, Inhibido.

E.coli MKTA 25922, Inhibido.

Aspergillus niger MKTA 16404, Correcto, Colonias negras y esporuladas en 5 días. Con respecto a PCA estandarizado*, recuento 73-475 %, pero de forma selectiva.

PRESENTACIÓN: TUBOS 20 ml, FRASCOS 100 y 250 ml,

MEDIO DESHIDRATADO, DESINFECTEST-LM, PLAQUITAS HERMETICAS MF

Medio de uso muy extendido para el aislamiento y recuento de hongos (levaduras y mohos) en la industria alimentaria. Es más útil para cultivo rápido que para recuento (para éste es mejor el Rosa Bengala CAF Agar).

El cloranfenicol actúa como antibacteriano termoestable de amplio espectro, lo que da al medio una excelente selectividad con respecto al Sabouraud Dextrose Agar. El medio se incuba a 20-25 °C aproximadamente, durante 3-5 días.

4.3.5.3. Siembra

Con los tubos 20 ml y los frascos se preparan placas. En éstas se siembra en superficie, extendiendo con un triángulo de vidrio flameado.

Las levaduras aparecen como colonias no filamentosas, a menudo mucosas. Los mohos crecen con colonias filamentosas y de margen difuso. Identificar al microscopio los mohos y con YEAST-IDENT las levaduras.

Material y métodos

El usuario final es el único responsable de la destrucción de los organismos que se hayan desarrollado, según la legislación medioambiental vigente.

4.3.6. Penicillium

BD Sabouraud GC Agar / CHROMagar Candida Medium (Biplate) USO
PREVISTO BD Sabouraud GC Agar / CHROMagar Candida

Medium (Biplate) (agar GC Sabouraud BD / medio CHROMagar para Candida [biplaca]) se utiliza para el aislamiento selectivo de hongos y para el aislamiento e identificación de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de muestras externas..

4.3.6.1. Principios y explicación del procedimiento.

Método microbiológico

El agar Sabouraud con glucosa es un medio de amplia utilización y parcialmente selectivo para hongos debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa. Dado que muchas bacterias toleran el bajo pH y la alta concentración de glucosa y crecen en agar Sabouraud, en especial durante incubación prolongada, a menudo necesaria para el aislamiento de hongos, se han desarrollado numerosas fórmulas con inhibidores antibacterianos. Se ha demostrado que los antimicrobianos tales como penicilina, cloranfenicol, aminoglucósidos o combinaciones de los mismos son efectivos para inhibir bacterias sin afectar el crecimiento de los hongos. En Sabouraud GC Agar las peptonas son fuente de nitrógeno.

La glucosa (dextrosa) es una fuente de energía para el crecimiento de los hongos. El cloranfenicol y la gentamicina son antibióticos de amplio espectro que inhiben una amplia variedad de bacterias gram negativas y gram positivas.

Material y métodos

CHROMagar Candida Medium es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos.

Al añadir sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que hace posible la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde de claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis* presentan un color azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei* presentan un color rosa claro con un borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosa o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida* [Torulopsis] glabrata y otras especies).

Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias. Las peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en CHROMagar Candida Medium. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación.

El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos. CHROMagar Candida Medium fue desarrollado por A. Rambach y lo vende BD Diagnostic Systems mediante un acuerdo de licencia con CHROMagar, París, Francia. REACTIVOS Fórmulas* por litro de agua purificada Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol CHROMagar Candida Medium Digerido pancreático de caseína 5,0 g Cromopeptona 10,0 g Digerido péptico de tejido

Material y métodos

animal 5,0 Glucosa 20,0 Glucosa 40,0 Mezcla cromógena 2,0 Agar 15,0 Cloranfenicol 0,5 Gentamicina 0,04 Agar 15,0 Cloranfenicol 0,4 pH $6,0 \pm 0,3$ pH $5,6 \pm 0,2$ *Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

4.3.6.2. Siembra

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa. Consultar referencia de métodos recomendados.

4.3.6.3 .Incubación

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

4.3.7. Resultados

Microorganismos	Crecimiento
Saccharomyces cerevisiae	Bueno
Aspergillus niger	Bueno
Candida albicans ATCC 10231	Bueno

4.3.8. Características del medio

Medio preparado: ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.

4.3.9. Almacenamiento

Material y métodos

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

Para su estudio y descripción hemos seguido diferentes metodologías, utilizando tanto para el microscopio óptico, el electrónico de barrido y el de transmisión.

Para conocer su momento de desarrollo realizamos unas improntas de los cultivos teñidas con azul de metileno.

Para su estudio al microscopio óptico, las colonias fueron fijadas en formol al 4%, e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 μm de grosor, y posteriormente los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. También se realizaron improntas en los porta y fueron teñidas con azul de metileno.

Los métodos de tinción que hemos utilizado con sus protocolos son los siguientes:

4.3.10. Fijación

En este paso el tejido obtenido se coloca en una sustancia fijadora, generalmente líquida, para evitar los cambios post-mortem y para lograr conservar la forma original del tejido. Unos de los fijadores más usado es el formol al 10% (formaldehído).

En el caso de que utilicemos más adelante el microscopio electrónico, usaremos:

4.3.11. Lavados

Se debe lavar el tejido para quitar el exceso de fijador (químico). El exceso de fijador al momento de la infiltración, incluso en la microtomía, podría afectar los cortes histológicos, y por ello se debe lavar con agua destilada.

La deshidratación se hace empleando diferentes soluciones de alcohol de concentración creciente.

Material y métodos

4.3.12. Aclaramiento

En este paso se sustituye el alcohol por un disolvente de parafina. El más usado es el xilol (xileno) ya que como la muestra está deshidratada, el xilol entrará hasta lo más profundo del tejido. También el tejido pierde color y adquiere un tono acaramelado.

4.3.13. Infiltración

En este paso la muestra se coloca en parafina líquida, cabe mencionar que se debe usar parafina histológica. Como se ha dicho en el paso anterior el tejido está completamente lleno de xilol, ahora debido a ósmosis sale el xilol y entra la parafina.

La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas.

4.3.14. Inclusión

Tiene como finalidad proporcionarle al tejido un soporte sólido que posibilite realizar un corte muy fino, por lo que es de suma importancia que el medio utilizado para la inclusión penetre al interior del tejido. Aquí se forman bloques de parafina dentro de los cuales están las muestras a estudiar. También hay máquinas especializadas para la inclusión en parafina de tejidos. Después de su inclusión y posterior secado, estos se deben poner a enfriar en un congelador para su posterior corte. Puede llevarse a cabo en Parafina

4.3.15. Microtomía

Se realizan cortes histológicos muy delgados según lo requerido o la costumbre del laboratorio donde se realice la técnica. Los cortes van desde 0,5 micras hasta 8 u 10 micras. Los cortes se echan al baño de flotación y se 'pescan' con un portaobjetos, se marcan con la fecha, el tipo de tejido y la tinción con que se van a procesar. El ángulo de corte entre el cuchillo del microtomo y el bloque ha de estar entre 10° y 15°. Una vez realizado el corte se da un baño de agua destilada, para que la parafina se estire. Un

Material y métodos

buen corte histológico debe tener un grosor aproximado de 3-5 micras para que sea fácilmente atravesado por la luz del sol y atraviase los poros celulares.

4.3.16. Tinciones

4.3.16.1. Técnica Tricrómico de Masson

Se trata de una técnica para la demostración de fibras colágenas.

- 1- Fijación: cualquier fijador es válido, si bien es de elección la solución de Bouin.
- 2- Cortes: en parafina.
- 3- MODO DE OPERAR tras la obtención de los cortes:

XILENO.....	10 MIN
XILENO.....	10 MIN
ALCOHOL 100.....	5 MIN
ALCOHOL 100.....	5 MIN
ALCOHOL 96.....	5 MIN
ALCOHOL 96.....	5 MIN
LAVAR CON AGUA CORRIENTE.....	5 MIN
SOLUCIÓN DE BOWIN A 56-60.....	1 HORA ESTUFA
LAVAR EN AGUA CORRIENTE HASTA QUE DESAPAREZCA EL COLOR AMARILLO	
LAVAR EN AGUA DESTILADA - HEMATOXILINA DE IRUM.....	10 MIN
LAVAR EN AGUA CORRIENTE.....	10 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA	
SOLUCIÓN DE BRIEBRICH-SCARLET FUCSINA ÁCIDA.....	5 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA	
SOLUCIÓN DE ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO ACUOSO 5%.....	15 MIN
SOLUCIÓN VERDE LUZ.....	20 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA	
SOLUCIÓN DE AGUA ACÉTICA AL 1%.....	4 MIN
PASAR POR AGUA CORRIENTE	
ALCOHOL 96.....	5 MIN
ALCOHOL 96.....	5 MIN
ALCOHOL 100.....	5 MIN
ALCOHOL 100.....	5 MIN
XILENO Y MONTAR	

4- Resultados:

- a. Núcleos.....Azul negruzco
- b. Citoplasmas, queratina, fibras musculares....Rojo
- c. Colágeno y reticulina..... Azul o verde

Material y métodos

4.3.16.2. Hematoxilina-eosina

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se teñirán los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

1°-Desparafinado. Estufa durante 30 min. a 60°. Sumergimos en xilol durante 10 o 15 min.	5°- Lavar en H2O-2min.
2°- Hidratación. Alcohol absoluto-5min. Alcohol 96°-5min. Alcohol 70°-5min.	6°-Eosina alcohólica-1min.
3°- Lavar en H2O destilada.	7°-Deshidratar. Alcohol de 70° Alcohol de 96°. Alcohol absoluto. Xilol.
4°- Hematoxilina-5min.	8°- Montaje.

Protocolo:

1. Las muestras se dejan en la estufa, por lo menos 10 minutos a 60°C o toda la noche a 37°C (desparafinación).
2. Xilol, 3 pasos de 5 a 10 minutos (final desparafinación).
3. Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 96°, 80°, 70°, de 3 a 5 minutos.
Acabar con un paso de agua (hidratación).
4. La hematoxilina se debe filtrar antes de empezar.
5. Hematoxilina durante 3-5 minutos.
6. Llevar la cubeta a la pila.

Material y métodos

7. Lavar la muestra en una cubeta con agua corriente de forma que rebose y eliminar el exceso de colorante.
8. La muestra se sumerge y se saca rápidamente en una cubeta con alcohol clorhídrico (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación).
9. Se neutraliza el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 minutos. Lavar con agua corriente durante varios minutos. Pasar por agua destilada antes de Las muestras se dejan en la estufa, por lo menos 10 minutos a 60°C o toda la noche a 37°C (desparafinación).
10. Xilol, 3 pasos de 5 a 10 minutos (final desparafinación).
11. Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 96°, 80°, 70°, de 3 a 5 minutos. Acabar con un paso de agua (hidratación).
12. La hematoxilina se debe filtrar antes de empezar.
13. Hematoxilina durante 3-5 minutos.
14. Llevar la cubeta a la pila.
15. Lavar la muestra en una cubeta con agua corriente de forma que rebose y eliminar el exceso de colorante.
16. La muestra se sumerge y se saca rápidamente en una cubeta con alcohol clorhídrico (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación).
17. Se neutraliza el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 minutos.
18. Lavar con agua corriente durante varios minutos. Pasar por agua destilada antes de seguir.
19. Sumergir la muestra en Eosina durante 3-5 minutos.

Material y métodos

20. Baño rápido con agua.
21. Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 70°, 80°, 96°, de 3 a 5 minutos.
Acabar con 3 pases de 100% (deshidratación).
22. Se acaba en xilol, en 2 o 3 cubetas, de 30 segundos a 5 minutos.
23. Montar de manera habitual.
24. Seguir.
25. Sumergir la muestra en Eosina durante 3-5 minutos.
26. Baño rápido con agua.
27. Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 70°, 80°, 96°, de 3 a 5 minutos.
Acabar con 3 pases de 100% (deshidratación).
28. Se acaba en xilol, en 2 o 3 cubetas, de 30 segundos a 5 minutos.
29. Montar de manera habitual.

Resultados:

La hematoxilina al ser básica tiñe ácidos, de color morado (núcleos con DNA y RNA), mientras que la eosina es un ácido y tiñe bases, de color rosado (citoplasma).

4.3.16.3. Técnica del PAS.

PAS:

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100°
- 3.- 10 min en etanol 96°

Material y métodos

- 4.- 10 min en etanol 80°
- 5.- 10 min en etanol 50°
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- Ácido peryódico al 0.5 % durante 5 min

Se oxidan las uniones carbono-carbono de los azúcares para formar grupos aldehídos.

- 8.- varios lavados en H₂O destilada
- 9.- Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad (el tiempo depende de la temperatura)

Los grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) resultando en un color rojo fucsia. Las secciones quedan de un color rosado.

Se puede dar un paso con una solución de metabisulfito potásico durante 2 minutos para eliminar los residuos de reactivo de Schiff de la muestra.

- 10.- 5 min en agua corriente
- 11.- Varios lavados en H₂O destilada
- 12.- 5 min en hematoxilina de Mayer
- 13.- 15 min en agua corriente
- 14.- 20 s en H₂O destilada
- 15.- 5 min en etanol 80°
- 16.- 5 min en etanol 96°
- 17.- 2x10 min en etanol 100°
- 18.- 2x10 min en xileno
- 19.- Montado con medio de montaje

Glúcidos: rosa intenso a fucsia

Núcleos: azul oscuro (en realidad se tiñe sólo la cromatina)

4.3.16.4. Azul de Metileno

1. Introducción. El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resulta difícil de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea y el medio más simple de aumentar el contraste entre la célula y el medio que la rodea es la utilización de colorantes.

Material y métodos

2. Tinción. Se entiende por tinción (o coloración) simple al teñido de los microorganismos aplicando sólo una solución colorante.
3. Tinción simple. Se usa un único colorante, que siempre es de tipobásico. Se utilizan solamente para incrementar el contraste; todas las células absorberán el colorante y quedarán teñidas del mismo color.
4. Descripción. El azul de metileno, cuyo nombre científico es Cloruro de Metiltionina, es un colorante que se usa para tratar una enfermedad llamada metahemoglobinemia.
5. Medicina. El azul de metileno se usa como tintura para teñir ciertas partes del cuerpo antes o durante la cirugía.
6. Propiedades. Esta sustancia tiene forma de cristales o polvo cristalino y presenta un color verde oscuro, con brillo bronceado. Es inodoro y estable al aire. Sus soluciones en agua o en alcohol son de color azul profundo.
7. FUNDAMENTO. La coloración con azul de metileno tiñe a todas las bacterias por igual. Se utiliza el colorante para teñir las estructuras presentes en el citoplasma de la bacteria. No es diferencial porque cuando se tiñen microorganismos con éste colorante tiñe a todos por igual, se comporta de la misma forma con una bacteria u otra

4.3.17. Observación de resultados al microscopio electrónico

Para su observación al microscopio electrónico las muestras se fijaron en glutaraldehído. Las correspondientes al BEM se desecaron y se recubrieron con oro coloidal, en tanto que para el TEM se incluyeron en resinas y tras su corte se contractaron con acetato de plomo y citrato de uranilo.

- 1°.- Fijación en glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M. pH 7,2-7,4.....2 horas mínimo.
- 2°.- Lavado en tampón fosfato 0,1 M + Sacarosa al 6,4 %.....2 horas
- 3°.- Postfijación en tetróxido de osmio al 1% en tampon fosfato+ sacarosa..... 1 hora
- 4°.- Lavado en tampón fosfato 0,1 M + Sacarosa al 6,4 %.....10 min.
- 5°.- Deshidratar en acetona 40%, 70%,10 min cada una..
- 6°.- Contrastar con acetato de uranilo al 1%.....10-12 horas.
- 7°.- Continuar deshidratación en acetona 100%, 2 pases de..... 30 min/cu.
- 8°.- Oxido de propileno.....15 min.

Material y métodos

9°.- Incluir en resina epoxi (Araldita)

- .a.- Oxido de propileno/ araldita en proporción 3/1.....30min.
- ..b.- Oxido de propileno/ araldita en proporción 1/1.....30min.
- ..c.- Araldita en estufa a 60°C.....48 horas.

4.3.17.1. Microscopio Óptico (MO)

Las muestras de las gónadas seleccionadas fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10% a temperatura ambiente, se deshidrataron en escala ascendente de etanol y fueron incluidos en parafina.

Las primeras secciones de cada bloque (4 μ m) fueron teñidas con hematoxilina/eosina para su estudio morfométrico e histopatológico. Los cortes fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Leitz Ortholux.

4.3.17.2. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) y de Transmisión(MET)

Pequeñas muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) a 4 °C durante toda la noche y, posteriormente refijadas en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7.4) durante 30 minutos. Después de la deshidratación en escala ascendente de alcoholes e inclusión en Araldita, los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes para el estudio ultraestructural fueron estudiados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1400 y el microscopio electrónico de barrido es Jeol 7800.

4.3.18. Procedimientos morfométricos y estereológicos

Material y métodos

El estudio cuantitativo se llevó a cabo mediante un sistema de análisis de imagen constituido por un microscopio triocular Leitz Ortholux conectado con un sistema informático digitalizador de imágenes por medio de una cámara de vídeo SONY SSC-C370P® y utilizando el programa informático Visilog 5®.

Los cortes histológicos de cada espécimen fueron muestreados de forma sistemática para seleccionar las imágenes microscópicas que fueron digitalizadas con objetivos de 10x (N.A. 0,25) y 40x (N.A. 0,70). En cada sección se capturaron una media de 7 campos, lo que teniendo en cuenta el número medio de secciones por muestra, contabilizaron una media de 28 campos capturados.

4.3.19. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI®), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media \pm desviación típica y un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Los estudios morfométricos se realizaron al MET, se realizaron contando 10 cuadrados de cada rejillas, que suponen 10 x10,000 y son 100,000 μm^2 la superficie medida.

5.- Resultados

5. Resultados

Los estudios que vamos a realizar en el presente capítulo corresponden a los diferentes hongos microscópicos obtenidos de telas de cuadros y maderas de esculturas, distribuidos en los siguientes grupos de investigación:

Primer grupo. Cultivo de *aspergillus niger* a los 5 días en lienzos.

Segundo grupo. Cultivo de *aspergillus niger* a los 10 días en lienzos.

Tercer grupo. Cultivo de *penicillium cándidum* a los 10 días en lienzos.

Cuarto grupo. Cultivos de *penicillium cándidum* a los 10 días en esculturas.

Resultados

5.1. PRIMER GRUPO. CULTIVO DE ASPERGILLUS NÍGER A LOS 5 DÍAS.

Macroscópicamente producen unas colonias bien desarrolladas con uniformidad en el color que, si bien se le detectan zonas negras como corresponden a este tipo de hongo, éstas son escasas y difusas y no se concentran en la zona central de las colonias.

El componente esencial de estos hongos son los conidióforos, formados por un tallo y la cabeza aspergilar. En este grupo se destaca que existe un pleomorfismo en los conidióforos, intercalándose de pequeños a grandes tamaños.

Para identificar a todos los elementos nos hemos basado en su disposición topográfica y en su morfología.

En muchas especies las paredes perforadas, o septos, dividen las hifas en células que contienen uno o dos núcleos. Los flujos protoplasmáticos a través de las aberturas de los septos proporcionan nutrientes a las células que se almacenan en las paredes de las hifas en forma de glucógeno. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas. La masa completa de hifas se llama micelio que primero se desarrolla por debajo de la tierra y después por encima.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras, que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo. No obstante hay un filo de hongos, que se asemeja a las algas, cuyas hifas generalmente no tienen septos y sus numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos, tales como las setas y los pedos o cuescos de lobo. Otros tipos de enormes estructuras de hifas permiten a algunos hongos sobrevivir en condiciones difíciles o ampliar sus fuentes nutricionales. Las fibras a modo de cuerdas del micelio de la armilaria, color de miel, facilitan la propagación de esta especie de un

Resultados

árbol a otro. Ciertos hongos forman masas de micelio resistentes con forma más o menos esférica llamadas esclerocios.

Tallo

Al microscopio óptico se aprecia un contenido citoplasmático irregular con grandes depósitos líquidos encerrados en grandes vacuolas. Su estudio al MET corresponde a un conjunto de células eucariotas con escasa actividad celular, encontrándose separadas entre sí por un espacio libre que corresponde a una segmentación septal. La membrana celular es lisa y está envuelto en capas irregulares de proteínas. Son células grandes y alargadas.

En las zonas de separación entre las células existen restos de citoplasma y los bordes de separación pueden ser lisos en los casos que haya concluido la citocinesis celular o con uniones densas de membrana en los que aún no ha concluido la última fase de la división.

Vesículas

El retículo endoplásmico está formado por sáculos o cisternas membranosas aplanados y comunicados entre sí con el retículo endoplásmico liso y con la membrana externa de la envoltura nuclear. Presenta ribosomas adheridos a su cara externa o citoplasmática dándole un aspecto rugoso. Estos ribosomas se unen a la membrana del retículo mediante glucoproteínas de fijación asociadas a un poro (receptor proteico de membrana asociado a un poro) que permitirán la penetración hacia el lumen de las proteínas fabricadas por los ribosomas adosados.

Las mitocondrias son unos orgánulos que están presentes en todas las células eucariotas, tanto animales como vegetales. Ocupa 1/5 del volumen citoplasmático.

Se localizan por todo el volumen celular y se desplazan asociadas a microtúbulos del citoesqueleto. Abundan en células del corazón y en el flagelo del espermatozoide.

Presentan distintos tamaños y formas dependiendo del tipo de célula y de su estado metabólico. Según su forma puede ser cilíndricas, esféricas u ovoideas. Su tamaño, cuando son cilindros alargados, es de 0,5 de diámetro y hasta 2 de longitud.

Resultados

El núcleo se presenta en dos estados que dependen de la fase del ciclo celular:

- núcleo en interfase: coincide con el periodo en el que la célula no se divide.
- núcleo en división: coincide con la mitosis.

Algunas de sus características son:

- forma: es muy variada. Normalmente es esférica.
- tamaño: suele ser de 2 a 25 de diámetro, aumentando considerablemente cuando ocurre la duplicación del material genético.
- posición: en células animales está centrado, pero en las vegetales está lateralizado.
- número: suele haber uno, pero las células musculares tienen muchos y las hepáticas tienen dos.

Métulas.

Es frecuente observarlas en división mitótica, alargándose y con dos polos, donde encontramos los núcleos que pueden estar mostrando los cromosomas. Cuando se aprecian los cromosomas éstos están poco organizados y tienen escasa densidad electrónica dándose los casos que dichos núcleos pueden estar en momentos diferentes, es decir, uno organizado y el otro mostrando los cromosomas.

El retículo rugoso es la expresión más patente del sistema membranoso interno que caracteriza a la célula eucariota, es el retículo endoplasmático. Se trata de una red tridimensional de cavidades limitadas por membranas que se extiende por todo el citoplasma. Estas cavidades presentan formas muy variadas (cisternas aplanadas, vesícula globular que está constituido por una o más pilas de vesículas membranosas aplastadas, denominadas sáculos, rodeadas de un enjambre de pequeñas vesículas esféricas. Se denomina así en honor a su descubridor, Camilo Golgi, que en 1898 puso a punto la técnica de tinción que permitió identificarlo.

Resultados

Cada una de las pilas de sáculos que integran el aparato de Golgi recibe el nombre de dictiosoma; cada dictiosoma mide alrededor de 1 μm de diámetro y agrupa unas 6 sáculos. Una célula puede contener uno o más dictiosomas dependiendo de cuál sea su función. Por ejemplo, las células secretoras, como las del páncreas, presentan aparatos de Golgi muy desarrollados, mientras que las células que no desarrollan actividad secretora suelen presentar un solo dictiosoma

El complejo de Golgi se encuentra estructural y funcionalmente polarizado. Presenta dos caras bien diferenciadas: la **cara cis** se sitúa próxima a las membranas del retículo endoplasmático y está rodeada de pequeñas vesículas, denominadas vesículas de transición, que derivan de él; la **cara trans** se encuentra próxima a la membrana plasmática y de ella parten unas vesículas más grandes, las vesículas secretoras. Existe un intenso tráfico de sustancias a través del aparato de Golgi que va desde la cara **cis** hacia la cara **trans**. Estas sustancias proceden del retículo endoplasmático, llegan a la cara **cis** en forma de vesículas de transición, va pasando de sáculo en sáculo y, por último, salen por la cara trans en forma de vesículas secretoras que se dirigen hacia diferentes destinos celulares.

La función del aparato de Golgi consiste en organizar y dirigir la circulación de las macromoléculas en la célula, constituyendo un verdadero centro de clasificación y distribución de diferentes tipos de productos que más tarde serán transportados bien a los lugares de la célula donde resultan necesarios o bien al exterior de la misma. Los productos que han de ser "exportados" fuera de la célula son seleccionados y embalados por el aparato de Golgi en forma de vesículas secretoras que luego vierten su contenido al medio extracelular en un proceso denominado exocitosis; el contenido de otras vesículas se incorpora a diferentes orgánulos celulares como lisosomas y peroxisomas. Por otra parte determinados procesos de modificación de macromoléculas, como la glicosilación de las proteínas que comienzan en el retículo endoplasmático, culminan en las sáculos del aparato de Golgi.

Resultados

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que están presentes en todas las células eucariotas. Dado que aparecen en elevado número (varios cientos o incluso miles por célula) ocupan un porcentaje significativo del volumen del citoplasma. El conjunto de las mitocondrias de una célula recibe el nombre de condrioma. Aunque pueden presentar formas variadas, la más común es la de un cilindro redondeado por sus extremos con $1\mu\text{m}$ de diámetro y $2\mu\text{m}$ de longitud aproximadamente. Esta forma y tamaño son muy similares a los de muchas bacterias. La mitocondria está limitada por dos membranas: la membrana mitocondrial externa y la membrana mitocondrial interna. Estas membranas definen dos compartimentos internos: el espacio intermembrana situado entre ambas, y la matriz mitocondrial, que es el compartimento principal y se halla delimitado por la membrana mitocondrial interna. La membrana mitocondrial interna presenta una serie de repliegues o invaginaciones, denominados crestas mitocondriales, que aumentan considerablemente su superficie.

Fiálides.

Las fiálides más cercanas a las métulas carecen de granulaciones y se denominan agranuladas. Inicialmente carecen de gránulos que aparecen posteriormente en las granuladas. Tienen un tamaño alrededor de $5\mu\text{m}$ de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaicos relacionados entre sí por una fina membrana. Son células ovoides o piriformes. Tienen un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones.

Dentro del citoplasma, y aparte del núcleo, se observa la presencia de ciertas formaciones de muy diverso aspecto y consistencia, que hemos dado en llamar orgánulos celulares y vamos a describir a continuación.

La actividad del retículo está estrechamente relacionada con la síntesis de proteínas. Las dos zonas que acabamos de definir intervienen de distinto modo en estos procesos. El

Resultados

retículo endoplasmático liso es responsable de: la síntesis de fosfolípidos y colesterol y el procesamiento de sustancias tóxicas procedentes del exterior de la célula.

Los ribosomas se encuentran tanto en las células procariotas como en las eucariotas. Están compuestos por RNA y proteínas. Son unos gránulos cuyas dimensiones se miden en millonésimas de milímetro, que se hallan situados sobre las membranas del retículo endoplasmático o sobre la cara externa de la membrana nuclear, o incluso aislados en el plasma. Contienen esencialmente ácidos nucleicos y macromoléculas de proteína en proporciones variables.

En los ribosomas tiene lugar la síntesis de proteínas, es decir, la unión de los aminoácidos de una proteína siguiendo una secuencia establecida genéticamente.

Las mitocondrias son minúsculos orgánulos celulares, descubiertos ya en 1886. Se hallan, generalmente en gran número, en casi todas las células vegetales y animales (células eucariotas). Suelen tener una forma cilíndrica, y un diámetro de 0,5 micrómetros. Observadas al microscopio electrónico presentan dos membranas separadas:

-La membrana interna, con repliegues hacia el interior o crestas que aumentan la superficie de la membrana. Contiene numerosas proteínas de transporte y otras con funciones muy especializadas, como los complejos que forman la cadena respiratoria y la ATP.

-La membrana externa. Contiene numerosas proteínas que regulan los intercambios de sustancias con el citosol. Destacan las proteínas de canal, las cuales forman grandes poros que la hacen muy permeable.

Las mitocondrias son los orgánulos especializados en proceso de respiración celular, ya que las enzimas necesarias para que se produzca dicho proceso están contenidos en estos orgánulos.

Resultados

El complejo de Golgi es un orgánulo común a todas las células eucariotas y está especialmente desarrollado en aquellas que tienen actividad secretora. El aparato de Golgi está constituido por escamas de 1 a 3 micras de diámetro.

Está constituido por una serie de cavidades planas paralelas, delimitadas por una membrana en cuya periferia hay unas vesículas llamadas asimismo de Golgi.

La función del aparato de Golgi consiste en el aislamiento dentro del citoplasma, y mediante una membrana, de algunas sustancias con el fin de llevarlas del interior del propio citoplasma a su parte exterior.

Así pues, el complejo de Golgi interviene en las secreciones y las excreciones celulares y protege a la célula de la acción tóxica de determinadas sustancias.

Las vacuolas son orgánulos característicos de las células vegetales aunque no exclusivos de ellas. Están rodeadas de una membrana denominada tonoplasto y en su interior se encuentra una sustancia fluida de composición variable. Las vacuolas pueden ocupar entre un 5 y un 90% del volumen celular aunque, de hecho, casi siempre es superior al 30%.

Desempeñan funciones muy diversas, hasta el punto de que en una misma célula pueden encontrarse vacuolas con funciones distintas.

Las fiálides granulares se localizan en las zonas más externas y muestran gránulos proteicos grandes y de mediana densidad electrónica y también hemos encontrado gránulos muy densos en escaso número y de pequeño tamaño que corresponden a gránulos de melanina. Estas granulaciones de melaninas serán las responsables de la coloración negra de las colonias, y se aprecian también al microscopio óptico con una coloración parda de su citoplasma. Todas las fiálides también se presentan en mitosis.

Conidios.

Morfológicamente se configuran por dos componentes: el interno, que corresponde a una pequeña célula eucariota con escasos organoides, y las correspondientes cubiertas. En las

Resultados

cubiertas recién formadas se destaca una densa y fina envuelta que proviene de los gránulos densos de las fiálides que posteriormente son excretados y organizan una membrana continua, homogénea y clara, con pequeñas espículas externas que se aprecian tanto al MEB como al MET.

Esporas

Estas cubiertas terminan fundiéndose y dan una o varias, de morfología similar y escasa densidad.

5.2. SEGUNDO GRUPO. ASPERGILLUS CULTIVADO DURANTE 10 DÍAS.

En nuestro trabajo hemos estudiado como segundo grupo de investigación los aspergillus niger a los 10 días de cultivo.

Como en el caso anterior, la parte esencial de los conidióforos están formados por un tallo y la correspondiente floración de la cabeza aspergilar, con la característica de que son uniformes, de grandes tamaños y de un color negro intenso.

Todos los componentes que forman los conidióforos están presentes en la cabeza aspergilar y tienen la misma morfología, a excepción de las fiálides que en definitiva son las responsables de la coloración negra de las colonias.

Dado que el tallo, las vesículas, las métulas, los conidios y las esporas son similares a las estudiadas anteriormente, vamos a describir solamente las fiálides por sus diferencias morfológicas.

Fiálides.

Estos componentes son más numerosos y se disponen en hileras y también en mosaicos. Estas células eucariotas se pueden dividir por su morfología y composición en dos grupos; las fiálides granulares y las fiálides pigmentadas. Ambas células las encontramos en fase de mitosis y en fase vegetativa.

Resultados

Fiálides granulares.

Estas fiálides son las más jóvenes y tienen un tamaño alrededor de 5 μm de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaico, relacionados entre sí por una finas membranas. Son células ovoides o piriformes y tienen un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones. El citoplasma es uniforme e incluso tienen más densidad que el núcleo, con numerosos ribosomas y algunas cisternas de retículo rugoso, y también mitocondrias de densidad similar al citoplasma pero con abundantes crestas. Algunas de estas células eucariotas las hemos encontrado en división celular, mostrando todas las fases de las placas mitóticas si bien los cromosomas están poco individualizados y se disponen como acúmulos de cromatina densa. En su citoplasma se aprecia gránulos de escasa densidad que participaran en la formación de las cápsulas de los conidios.

Las fiálides pigmentadas son muy similares a las anteriores, aunque con dos diferencias esenciales, por una parte son de mayor tamaño, de alrededor de 6 μm de diámetro, y sobre todo la existencia en el citoplasma de varios gránulos como los anteriores pero, sobre todo, gránulos muy densos, de grandes proporciones y formados exclusivamente por material muy denso y homogéneo. Estas últimas granulaciones las identificamos como melaninas que serán las responsables de la coloración negra de las colonias. Al microscopio óptico le da una coloración parda de su citoplasma. Son frecuentes las divisiones mitóticas.

Las células correspondientes a las vesículas, que se inician en el cono, se disponen de forma radial y tienen forma alargada, iniciando la disposición radial del resto de componentes. Estas células tienen una pared rígida y su componente celular es alargado y está rodeado de espacios claros. La existencia de escasas mitosis, con escasos cromosomas, indica que su división mitótica para producir las métulas es muy rápida.

Resultados

Los estudios realizados al TEM de las m etulas indican que estos componentes son de transición y carecen de relevancia funcional, como indican sus escasos organoides citoplasmáticos y que su presencia sea corta, como indican las mitosis que darán paso a la formación de las fiálides.

Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforo, las células eucariotas que tienen mayor actividad funcional son las fiálides. Por una parte el gran número de mitosis que hemos observado indica un aumento en el número de células que posteriormente se transformarn en los conidios, y que no solo actúa como una zona germinal, sino que por lo contrario sus numerosos componentes citoplasmáticos facilitarán la formación de los conidios e incluso el dar la coloración negra a las colonias. Dentro de las granulaciones existentes se desprenden dos funciones importantes, en primer lugar los gránulos proteicos claros que tienen una clara función de producir las envueltas de los conidios y posteriormente las esporas, y en esta formación de los gránulos proteicos participa fundamentalmente su retículo rugoso. Y en segundo lugar los gránulos muy densos corresponden a melanina.

De las descripciones que hemos realizado tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión se deduce que la coloración negra de las colonias se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las fiálides pigmentadas. Hemos podido comprobar que en aquellos conidióforos cuyas fiálides contienen más pigmento se traduce en una mayor coloración de las colonias. En las colonias jóvenes en las que su coloración es homogénea y apenas oscura indica que la melanina es escasa y está distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo, macroscópicamente el aumento del color negro y su disposición central en la colonia parece indicar que los conidióforos tienen un mayor número de fiálides pigmentadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias.

Resultados

Las hifas, para poder realizar todos los mecanismos de maduración, tienen una disposición especial, de ahí que presenten una disposición a modo de mosaico en la fase de síntesis de las granulaciones, y en hileras cuando están en fase de transición a los conidios.

Los conidióforos y las esporas son similares a las descritas en el grupo anterior.

5.3. TERCER GRUPO. PENICILLIUM

Tallo

De las células que configuran el tallo destacamos sus diferentes componentes.

El retículo endoplásmico rugoso es muy abundante en células encargadas de la síntesis de proteínas. La síntesis, transporte, almacenamiento y glicosilación de las proteínas son las funciones más importantes. El almacenamiento se realiza en el lumen y para que la proteína se mueva tiene que ser glicosilada. Esto consiste en la unión de un oligosacárido a una proteína para que ésta pueda ser transportada hasta el aparato de Golgi donde del monosacárido desaparecerá.

El REL está constituido por una serie de túbulos interconectados que recorren todo el citoplasma. Está comunicado con el retículo endoplásmico rugoso pero no presenta ribosomas en su exterior y es muy abundante en células encargadas de sintetizar lípidos y hormonas esteroides.

El desarrollo del Golgi es variable, dependiendo del tipo de células y la actividad que desarrollen abunde en células secretoras. Se encarga del transporte de proteínas procedentes del retículo hasta el lugar que la célula las necesite.

Las mitocondrias están constituidas por una membrana externa lisa y una membrana interna muy plegada formando invaginaciones que reciben el nombre de crestas mitocondriales.

Resultados

Entre las dos membranas queda un espacio llamado intermembranoso e interiormente queda una cavidad llamada matriz.

La membrana externa es muy permeable porque posee muchas porinas (proteínas de transmembrana) que se encuentran formando los poros de membranas. La membrana interna es prácticamente impermeable a las sustancias pequeñas e iones y permeable al oxígeno molecular y al agua. Las crestas permiten que aumente la superficie.

La matriz contiene una solución gelatinosa con un 50% de agua, enzimas y distintos tipos de sustratos. Además hay una molécula de ADN y ribosomas (adosados o sueltos). Se pueden formar por división de otra mitocondria anterior. Sólo pasa esto con mitocondrias y cloroplastos porque son los únicos que tienen ADN.

El núcleo está formado por una envoltura nuclear que interiormente encierra el nucleoplasma y que en él se encuentra el/los nucleolos y en él está la cromatina que forma los cromosomas.

La envoltura nuclear es una doble membrana que envuelve al nucleoplasma y se comunica por el retículo endoplásmico rugoso. No es continua. Se encuentra atravesada por los poros nucleares, a través de los cuales se realiza el intercambio. Esta doble membrana está formada por una membrana externa que se encuentra en contacto con el citoplasma y puede presentar ribosomas pegados. Interiormente se comunica con el espacio perinuclear. La membrana interna comunica con el nucleoplasma y el espacio perinuclear y es lisa.

El espacio perinuclear tiene la misma función que el lumen del retículo endoplásmico. La membrana se encuentra recorrida por los poros, que son un complejo de proteínas que permiten el intercambio entre el citoplasma y el nucleoplasma. La función de la envoltura nuclear es proteger el material genético.

El nucleoplasma es el medio interno del núcleo, recibe también el nombre de jugo nuclear o carioplasma.

Resultados

En el interior del nucleoplasma está el nucleolo, que es una estructura esférica con aspecto esponjoso y carente de membrana. Su diámetro es de 1-3 μ m y aparece en el número de 1 o 2 en cada núcleo.

La estructura: está constituido por proteínas, cadenas de ARN y algún ADN.

La función: sintetizar y organizar los componentes del ribosoma tanto la subunidad mayor como la menor (ARNr).

La cromatina está constituida por filamentos de ADN que constituyen el material genético. Aparece en la interfase y se encuentra disgregada ocupando todo el nucleoplasma. Durante la mitosis esta cromatina forma los cromosomas.

Conidióforos.

Tienen abundantes orgánulos, los ribosomas están formados por dos subunidades, una mayor que la otra. La subunidad menor posee menos proteínas que la mayor y la mayoría de ellas son diferentes de las que presenta la otra subunidad. Además de los ribosomas que están libres o adosados al retículo endoplasmático rugoso los podemos encontrar en las mitocondrias.

Los ribosomas forman polisomas para realizar cualquier tipo de síntesis proteica, tanto la efectuada por los ribosomas libres como por los asociados a la membrana del retículo endoplasmático rugoso. El número de ribosomas que forman un polisoma y la longitud del ARNm que los une varían según el peso molecular de la proteína que se va a sintetizar.

Para la síntesis de proteínas los ribosomas recorren el ARNm desde un extremo a otro. Por cada tres nucleótidos recorridos incorporan un aminoácido (proporcionado por un ARNt) a la cadena de proteína que están sintetizando. Cuando han completado el recorrido, los ribosomas se liberan del ARNm y sueltan la proteína ya terminada. Mientras se esté sintetizando la proteína, por cada ribosoma que abandona el polisoma en el extremo final, otro se incorpora en el inicial, de modo que el polisoma mantiene una apariencia estable aunque sus ribosomas cambien.

Resultados

Retículo endoplasmático rugoso: sus membranas son más delgadas que la membrana plasmática y tienen un mayor contenido en proteínas. Los ribosomas se fijan a la membrana del retículo endoplasmático rugoso por la subunidad mayor y solo aquellos con un péptido, señal específica (que reconocen las proteínas receptoras del ribosoma). La función de este orgánulo es el almacenamiento de las proteínas sintetizadas por los ribosomas para su glicosilación (proceso que forma parte de la maduración de las proteínas en el que se le añaden oligosacáridos). Las proteínas que se almacenan se utilizan para la:

Secreción celular: las proteínas pasan al complejo de Golgi y desde éste pasan a las vesículas que después verterán su contenido al exterior por exocitosis. La secreción puede ser de dos tipos:

- **Secreción constitutiva:** que implica la renovación de la membrana plasmática.
- **Secreción celular regulada:** que implica la secreción celular propiamente dicha (por ejemplo enzimas) y también la renovación de la membrana plasmática por parte de las membranas de la vesícula.

El complejo de GOLGI consta de varias unidades, probablemente conectadas entre sí, denominadas dictiosomas. Cada dictiosoma es un conjunto de sáculos apilados, separados entre sí y en cuya periferia hay vesículas de diversos tamaños. La cara más próxima al núcleo celular o cara proximal se denomina cara externa o cara cis. Es de forma convexa y presenta muchas fenestraciones. En su periferia hay túbulos y vesículas. Los túbulos conectan con otros dictiosomas. Las vesículas provienen del retículo endoplasmático rugoso, que le transfieren su contenido, por lo que se llaman vesículas de transición. Las siguientes cisternas son cada vez menos fenestradas y con cada vez menos vesículas y túbulos. La cara más próxima a la membrana plasmática, o cara distal, se denomina cara interna o cara trans; la luz de las cisternas es más amplia que en las de la cara cis (va aumentando progresivamente) y de su

Resultados

superficie emigran grandes vesículas denominadas vacuolas de condensación o gránulos de secreción. La membrana del aparato de Golgi es trilaminar, de menor espesor que la plasmática y de similar estructura que la mayoría de las membranas citoplasmáticas, aunque se cree que va aumentando de espesor desde la cara cis hasta la trans para que las vesículas que abandonan el aparato de Golgi tengan el mismo espesor que la plasmática a la que se unirán.

Las vesículas de secreción, tanto las de secreción regulada como las de secreción constitutiva, proceden de la cara trans del aparato de Golgi y se unen a la membrana plasmática liberando el contenido. Con la secreción se va incrementando la membrana plasmática de la célula y hace falta una recuperación de ese exceso de membrana; esta recuperación se realiza mediante las vesículas de endocitosis. De esta forma se produce un reciclaje de membrana.

Las vesículas pueden ir no sólo a la membrana plasmática sino a destinos intracelulares, como a lisosomas. En este caso también se establece un reciclaje de membrana con unas vesículas de ida hacia los lisosomas y otras de vuelta desde éstos hacia el aparato de Golgi.

Las vesículas emigran a una zona u otra en función de unos marcadores en su parte externa hasta encontrar el receptor al que unirse. Siguen una dirección u otra en función de la polaridad.

Las mitocondrias presentan una doble membrana (externa e interna); la membrana interna presenta invaginaciones hacia el interior que constituyen tabiques denominados crestas. Éstas no llegan de un lado a otro de la mitocondria, por lo que la compartimentación que producen es abierta.

El número de crestas es muy variable y, normalmente, va relacionado directamente con las necesidades de producción energética de la célula. Se orientan preferentemente perpendiculares al eje longitudinal de la mitocondria. El interior de las mitocondrias está constituido por un contenido más o menos fluido denominado matriz mitocondrial.

Resultados

Los ribosomas mitocondriales son generalmente más pequeños que los del citoplasma. Sintetizan algunas proteínas de la mitocondria, principalmente ciertas proteínas integrales de la membrana interna. Las restantes proteínas se importan del citoplasma.

En las células eucariotas el núcleo está rodeado por una membrana nuclear, mientras que en las procariotas no existe dicha membrana por lo que el material nuclear está disperso en el citoplasma. También se la llama carioplasma y suele tener una forma redondeada o elíptica en las células prismáticas, en el centro de la célula, y mantiene casi siempre esta posición. El núcleo de una célula normal puede presentarse en dos formas distintas, según sea el estadio en que se halle la propia célula.

Al comenzar la división celular o mitosis se distinguen en el núcleo unos corpúsculos característicos susceptibles de ser coloreados: son los cromosomas, portadores de los factores hereditarios o genes. Cuando la célula permanece sin dividirse (periodo interfase), el núcleo presenta una estructura interna filamentosa, poco visible al microscopio óptico, en la que destaca un orgánulo denominado nucléolo.

Los Cromosomas. La función del núcleo, que consiste en transmitir de una a otra célula la información genética que posee sin modificarla ni empobrecerla, se realiza propiamente en el momento de la división celular, que es consecuentemente el de la división del núcleo. Esta división, la mitosis, provoca un importante cambio de forma en el núcleo, que se presenta al microscopio bajo la forma de los llamados cromosomas.

Son unos a modo de bastoncillos, curvos o en forma de V, que en el curso de la mitosis aparecen siempre claramente diferenciados e individualizados. No se conoce todavía de modo exacto la estructura de cada cromosoma, pero se supone que cada uno de ellos consta de una o varias dobles hélices de ADN, varias veces envueltas sobre sí mismas. El número de cromosomas de cada célula es constante para cada especie, pero se reduce a la mitad en las

Resultados

células germinales o gametos. En razón de este fenómeno, a estas células se las llama haploide, frente a la denominación de diploides que tienen las demás.

El nucléolo. Es un pequeño orgánulo, fácilmente distinguible con el microscopio óptico debido a su tamaño (1 a 7 micrómetros de diámetro). Su tamaño y su morfología son no obstante, variables en función de la especie, del tipo celular y del estado fisiológico de la célula. Tienen forma redondeada, que desaparece durante la división celular, pero mantiene contacto con regiones definidas de algunos cromosomas. En realidad, el nucléolo es elaborado por los cromosomas, y contiene principalmente proteínas, ARN, lípidos y algunos enzimas.

Vesículas.

Estas células son muy numerosas y con gran riqueza de organoides celulares y son similares a las descritas en los estudios correspondientes a los aspergillus.

Métulas.

Estas células eucariotas se caracterizan por presentar un sistema compartimentado mediante endomembranas. Una de estas, la doble membrana nuclear, aísla el material genético del resto de la célula.

En esta célula eucariota tipo, animal o vegetal, podemos diferenciar:

Membrana plasmática que limita la célula. En células que forman tejidos animales, se proyectan hacia el exterior fibras que se entrecruzan y forman la matriz extracelular. En la parte externa de las células vegetales se encuentra la pared celular.

Hialoplasma o citosol. Solución coloidal en la que están inmersos los orgánulos citoplasmáticos y una matriz fibrosa denominada citoesqueleto del que derivan prolongaciones (cilios y flagelos) conectadas con los centriolos.

Sistema membranoso formado por varias estructuras: retículo endoplasmático, conjunto de tubos y vesículas interconectados formando el RE liso y el RE rugoso; aparato de Golgi, conjunto de vesículas donde se acumulan y maduran las proteínas; los lisosomas y los

Resultados

peroxisomas que acumulan enzimas; vacuolas, con diversas funciones; y las vesículas de secreción, que vierten su contenido al exterior y derivan del aparato de Golgi.

Ribosomas. Tienen un coeficiente de sedimentación de 80S, mayor que en las células procariotas. Su función es la biosíntesis de proteínas.

Orgánulos energéticos. Mitocondrias: son orgánulos encargados de oxidar las moléculas biológicas para formar ATP. Las células vegetales contienen, además, unos orgánulos similares, los cloroplastos, donde se realiza la fotosíntesis.

Material genético, rodeado por una doble membrana. Se encuentra empaquetado formando fibras de cromatina (interfase) o cromosomas (durante la división celular). Dentro del núcleo se localiza el nucleolo que, junto con el material genético, quedan inmersos en el nucleoplasma.

Los ribosomas son orgánulos no membranarios que por su pequeño tamaño (unos 30 nm) escapan a la observación mediante el microscopio óptico pero resultan visibles al microscopio electrónico. Más que como verdaderos orgánulos pueden ser considerados como complejos supramoleculares formados por RNA y proteínas. Cada ribosoma está formado por dos subunidades de diferente tamaño que pueden asociarse y disociarse de modo reversible. La subunidad mayor está constituida por tres moléculas de RNA ribosómico (uno de los cuatro tipos de RNA presentes en las células) y unas 45 moléculas proteicas diferentes; las tres moléculas de rRNA difieren en la longitud de su cadena polinucleotídica. La subunidad menor contiene una sola molécula de rRNA y unas 33 moléculas proteicas. Los ribosomas están presentes en el hialoplasma de todas las células eucariotas. Pueden encontrarse en estado libre, formando asociaciones transitorias denominadas polisomas, o bien adheridos a la cara externa de las membranas del retículo endoplasmático rugoso. También aparecen ribosomas en el interior de algunos orgánulos como mitocondrias y cloroplastos. La función de los ribosomas está relacionada con la síntesis de proteínas. Son el lugar donde se lleva a cabo el ensamblaje

Resultados

ordenado de los aminoácidos que integran las cadenas polipeptídicas. El papel concreto que juegan los ribosomas en este proceso no es todavía bien conocido.

La expresión más patente del sistema membranoso interno que caracteriza a la célula eucariota es el retículo endoplasmático. Se dispone de una red tridimensional de cavidades limitadas por membranas que se extiende por todo el citoplasma. Estas cavidades presentan formas muy variadas (cisternas aplanadas, vesículas globulares que están constituidas por una o más pilas de vesículas membranosas aplastadas, denominadas sáculos, rodeadas de un enjambre de pequeñas vesículas esféricas.

El aparato de Golgi se encuentra estructural y funcionalmente polarizado. Cada una de las pilas de sáculos que integran el aparato de Golgi recibe el nombre de dictiosoma; cada dictiosoma mide alrededor de 1 μm de diámetro y agrupa unas 6 sáculos. Una célula puede contener uno o más dictiosomas dependiendo de cuál sea su función. Por ejemplo, las células secretoras, como las del páncreas, presentan aparatos de Golgi muy desarrollados, mientras que las células que no desarrollan actividad secretora suelen presentar un solo dictiosoma

La función del aparato de Golgi consiste en organizar y dirigir la circulación de las macromoléculas en la célula, constituyendo un verdadero centro de clasificación y distribución de diferentes tipos de productos que más tarde serán transportados bien a los lugares de la célula donde resultan necesarios o bien al exterior de la misma. Los productos que han de ser "exportados" fuera de la célula son seleccionados y embalados por el aparato de Golgi en forma de vesículas secretoras que luego vierten su contenido al medio extracelular en un proceso denominado exocitosis; el contenido de otras vesículas se incorpora a diferentes orgánulos celulares como lisosomas y peroxisomas. Por otra parte, determinados procesos de modificación de macromoléculas, como la glicosilación de las proteínas que comienzan en el retículo endoplasmático, culminan en las sáculos del aparato de Golgi.

Resultados

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que están presentes en todas las células eucariotas. Dado que aparecen en elevado número (varios cientos o incluso miles por célula) ocupan un porcentaje significativo del volumen del citoplasma. El conjunto de las mitocondrias de una célula recibe el nombre de condrioma. Aunque pueden presentar formas variadas, la más común es la de un cilindro redondeado por sus extremos con $1\mu\text{m}$ de diámetro y $2\mu\text{m}$ de longitud aproximadamente. Esta forma y tamaño son muy similares a los de muchas bacterias. La mitocondria está limitada por dos membranas: la membrana mitocondrial externa y la membrana mitocondrial interna. Estas membranas definen dos compartimentos internos: el espacio intermembrana, situado entre ambas, y la matriz mitocondrial que es el compartimento principal y se halla delimitado por la membrana mitocondrial interna. La membrana mitocondrial interna presenta una serie de repliegues o invaginaciones, denominados crestas mitocondriales, que aumentan considerablemente su superficie

Esta célula eucariota se caracteriza por tener su material genético encerrado en una estructura de aspecto globular que recibe el nombre de núcleo.

La presencia constante de esta estructura en las células de tejidos animales y vegetales fue establecida ya desde los primeros tiempos de la teoría celular. Cada célula tiene normalmente un sólo núcleo, pero algunas pueden tener dos o más.

El núcleo suele ser un cuerpo esférico, sin embargo en ocasiones su forma guarda relación con la de la célula. Así, cuando la célula es alargada (como muchas células vegetales) el núcleo también se alarga orientándose según el eje mayor de la misma. También existen en algunas células núcleos de formas muy sofisticadas (lobulados, estrellados, etc.). El tamaño del núcleo es variable, pero guarda relación con el tamaño celular. Cuando el cociente entre el volumen nuclear y el volumen del citoplasma (relación núcleo-citoplasmática) cae por debajo de un determinado umbral, se desencadena el mecanismo de la división celular. El núcleo y el citoplasma se encuentran separados por la envoltura nuclear. Esta envoltura consiste en una

Resultados

doble membrana que, como hemos visto anteriormente, no es más que una porción especializada de las membranas del retículo endoplasmático; la cavidad interior definida por estas dos membranas, denominada espacio perinuclear, se continúa con la luz del retículo.

Durante el proceso de división celular la envoltura nuclear se desgaja y sus membranas se "diluyen" entre las del retículo endoplasmático; cuando finaliza la división, una zona determinada de este retículo rodea a los núcleos hijos para formar las nuevas envolturas nucleares. Las dos membranas que forman la envoltura entran en mutuo contacto en algunos puntos dando lugar a unas aberturas denominadas poros nucleares que comunican el núcleo con el citoplasma. Los poros se hallan rodeados de una estructura formada por ocho gránulos proteicos, el complejo del poro, encargada de regular el tráfico de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma. Debido a la presencia de estas discontinuidades (poros), la envoltura nuclear no constituye una barrera demasiado selectiva para la mayoría de las biomoléculas disueltas. Por lo tanto, el medio interno del núcleo, denominado jugo nuclear o nucleoplasma, tiene una composición química bastante similar a la del citosol.

En el jugo nuclear se hallan suspendidos los restantes componentes del núcleo, a saber: el nucléolo y la cromatina.

El nucléolo es un corpúsculo esférico, denso y de aspecto granular, con alto contenido en RNA y proteínas. En él se sintetiza el RNA ribosómico que se ensambla a continuación con las proteínas ribosómicas sintetizadas en el citoplasma para dar lugar a las subunidades mayor y menor de los ribosomas. Estas subunidades son exportadas al citoplasma donde a su vez se ensamblan para constituir los ribosomas.

La cromatina es una sustancia de aspecto fibroso que se encuentra dispersa por todo el nucleoplasma y se tiñe intensamente con colorantes básicos. Se compone de DNA y unas proteínas de carácter básico denominadas histonas. Es el componente principal del núcleo: en

Resultados

ella, en forma de secuencias de nucleótidos del DNA, se encuentra almacenada la información genética que gobierna todos los procesos celulares.

Fiálides.

Estas células eucariotas se caracterizan por presentar un sistema compartimentado mediante endomembranas. Una de éstas, la doble membrana nuclear, aísla el material genético del resto de la célula.

En esta célula eucariota tipo, animal o vegetal, podemos diferenciar:

Membrana plasmática que limita la célula. En células que forman tejidos animales se proyectan hacia el exterior fibras que se entrecruzan y forman la matriz extracelular. En la parte externa de las células vegetales se encuentra la pared celular.

Hialoplasma o citosol. Solución coloidal en la que están inmersos los orgánulos citoplasmáticos y una matriz fibrosa denominada citoesqueleto del que derivan prolongaciones (cilios y flagelos) conectadas con los centriolos.

Sistema membranoso formado por varias estructuras: retículo endoplasmático, conjunto de tubos y vesículas interconectados formando el RE liso y el RE rugoso; aparato de Golgi, conjunto de vesículas donde se acumulan y maduran las proteínas; los lisosomas y los peroxisomas que acumulan enzimas; vacuolas, con diversas funciones; y las vesículas de secreción, que vierten su contenido al exterior y derivan del aparato de Golgi.

Ribosomas. Tienen un coeficiente de sedimentación de 80S, mayor que en las células procariontas. Su función es la biosíntesis de proteínas.

Orgánulos energéticos. Mitocondrias: son orgánulos encargados de oxidar las moléculas biológicas para formar ATP. Las células vegetales contienen, además, unos orgánulos similares, los cloroplastos, donde se realiza la fotosíntesis.

Material genético, rodeado por una doble membrana. Se encuentra empaquetado formando fibras de cromatina (interfase) o cromosomas (durante la división celular). Dentro del

Resultados

núcleo se localiza el nucleolo que, junto con el material genético, quedan inmersos en el nucleoplasma.

La célula eucariota vegetal tiene las mismas características y morfología que la célula animal aunque con dos salvedades: presenta pared celular y plastos. Además, carece de centriolos y su vacuola suele ser única y de gran tamaño.

El contenido celular comprende el citoplasma y el núcleo. El citoplasma comprende a su vez el hialoplasma, que es el medio interno de la célula, y una serie de estructuras inmersas en él que se denominan orgánulos celulares. Los orgánulos celulares presentan aspectos muy variados: algunos son simples complejos supramoleculares carentes de membrana, como los ribosomas o los centriolos; otros son compartimentos celulares delimitados por membranas, que pueden ser sencillas o dobles (como en mitocondrias y cloroplastos). Todavía en el hialoplasma se pueden distinguir una fracción soluble, formada por agua y biomoléculas disueltas,

Conidios.

Son células de pequeño tamaño, de formas de esféricas a ovoides, y suelen disponerse relacionados entre sí a modo de hileras. Morfológicamente se configuran por dos componentes, el interno que corresponde a una pequeña célula eucariota con escasos organoides, y las correspondientes cubiertas. En las cubiertas recién formadas se destaca una densa y fina envuelta, que proviene de los gránulos densos de las fiálides que posteriormente son excretados y organizan una membrana continua, homogénea y clara, con pequeñas espículas externas que se aprecian tanto al MEB como al MET.

Esporas

Son muy numerosas, esféricas a ovoides, de superficie espiculada. Están configuradas por dos elementos, el interno que es una célula eucariota que en fases iniciales apenas tiene desarrollo y que finalmente apenas se diferencian sus componentes al tener todos ellos una densidad intensa y de contornos inapreciables. Y las cubiertas externas, en las que, si se

Resultados

observan recién formadas, encontramos una interna densa a los electrones y la más externa clara y con espículas externas. Estas cubiertas terminan fundiéndose y dan una o varias, de morfología similar y escasa densidad.

5.4. CUARTO GRUPO. PENINCILIUM CÁNDIDUM DE ESCULTURA

Tallo

Está formado por un tallo único, muy grueso y liso, sin que tenga ramificaciones y termina en una floración a modo de copa de vesículas y células eucariotas.

Vesículas

Están formadas por células eucariotas, que se caracterizan por presentar una membrana simple, el núcleo pequeño y denso, y lo que más se destaca es un citoplasma, que se caracteriza porque la mayoría de él contiene los orgánoides como son las mitocondrias, retículo endoplasmico y complejo de Golgi, y junto a ellas se localiza el núcleo. El resto de citoplasma está ocupado por gruesas vacuolas líquidas.

El complejo de Golgi está cerca del centrosoma aunque se origina a partir del retículo endoplásmico por medio de vesículas que posteriormente se unen. Y está formado por dictiosomas, que son agrupaciones de 3 a 10 sáculos membranosos aplanados y por vesículas de secreción que se desprenden de estos. Presenta polaridad y por lo tanto dos caras:

- cara cis o de formación : cerca del retículo endoplásmico.
- cara trans o de maduración: por donde salen las moléculas transportadas por el Golgi en vesículas.

Métulas.

Formadas por células eucariotas, que se dividen por mitosis y se disponen a modo de una estrecha banda de células que se localizan topográficamente entre las vesículas y las

Resultados

fiálides. Estos componentes suelen estar en escaso número, y se presentan tanto en fase mitótica como vegetativa.

En la fase vegetativa, las métulas son esféricas de unos 3 μm de diámetro, y al TEM son claros y de escasa densidad. Tienen un núcleo esférico y grande, que ocupa gran parte del citoplasma y muestra una envoltura nuclear dilatada con abundantes poros y con un perfil irregular de bordes dentados, y su cromatina es clara y homogénea; este hecho nos facilita la identificación de estos componentes. El citoplasma es escaso, y tiene pocos orgánoides, apreciándose ribosomas y algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, y también se destaca mitocondrias que son escasas pero tienen un gran desarrollo. Finalmente destacamos que son células poco diferenciadas y con escasa cantidad de sustancias metabólicas.

Los ribosomas son orgánulos no membranarios que por su pequeño tamaño (unos 30 nm) escapan a la observación mediante el microscopio óptico pero resultan visibles al microscopio electrónico. Más que como verdaderos orgánulos pueden ser considerados como complejos supramoleculares formados por RNA y proteínas. Cada ribosoma está formado por dos subunidades de diferente tamaño que pueden asociarse y disociarse de modo reversible. Los ribosomas están presentes en el hialoplasma de todas las células eucariotas. Pueden encontrarse en estado libre formando asociaciones transitorias denominadas polisomas, o bien adheridos a la cara externa de las membranas del retículo endoplasmático rugoso. También aparecen ribosomas en el interior de algunos orgánulos como mitocondrias y cloroplastos. La función de los ribosomas está relacionada con la síntesis de proteínas. Son el lugar donde se lleva a cabo el ensamblaje ordenado de los aminoácidos que integran las cadenas polipeptídicas. El papel concreto que juegan los ribosomas en este proceso no es todavía bien conocido.

Fiálides.

Resultados

Estas células eucariotas son las responsables esenciales en la formación de las células reproductoras. Se disponen en acúmulos a modo de mosaico y posteriormente en hileras. Estas células se caracterizan por presentar en su citoplasma dos tipos de granulaciones; gránulos de naturaleza proteica de grandes proporciones y de escasa densidad electrónica y otros gránulos muy densos a los electrones. La presencia de estos gránulos diferencia dos tipos de fiálides, las primeras que poseen los gránulos menos densos y son las responsables de producir las envueltas proteicas de los conidios y las segundas que poseen los gránulos muy densos y que se identifican con melaninas y serían las fiálides pigmentadas. En estos hongos predomina el primer grupo, estando las pigmentadas en escaso número. Ambos tipos celulares pueden presentar los dos gránulos, pero predominando uno de ellos.

El RER se encuentra en todas las células eucariotas y ocupa hasta el 10% del espacio interior de éstas.

Se trata de un sistema de membranas cuyas dimensiones dependen del estado fisiológico de la célula. Es más reducido en las células poco activas o poco diferenciadas. Forma una red de pequeños canales múltiples, comunicantes entre sí, que atraviesan el citoplasma y van desde la membrana nuclear a la citoplasmática.

En puntos diversos forma pequeñas cavidades o vesículas, y está constituido por una doble lámina que limita dos espacios: el citoplasmático y el reticular. El espacio que queda limitado en el interior se denomina lumen. La membrana externa puede ser lisa, no presenta ribosomas y se denomina retículo endoplasmático liso, o puede ser rugosa, que presenta ribosomas y se denomina retículo endoplasmático rugoso.

Conidios.

Son células de pequeño tamaño, de formas de esféricas a ovoides, y suelen disponerse relacionados entre sí a modo de hileras.

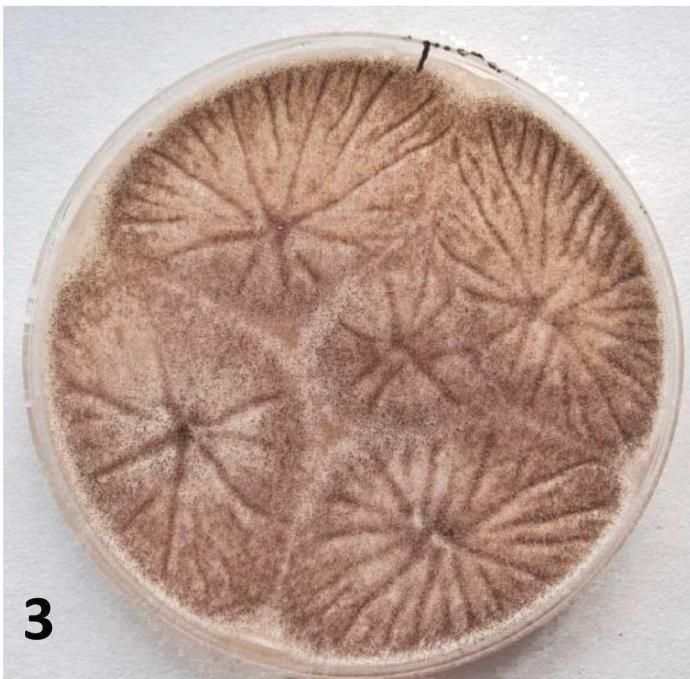
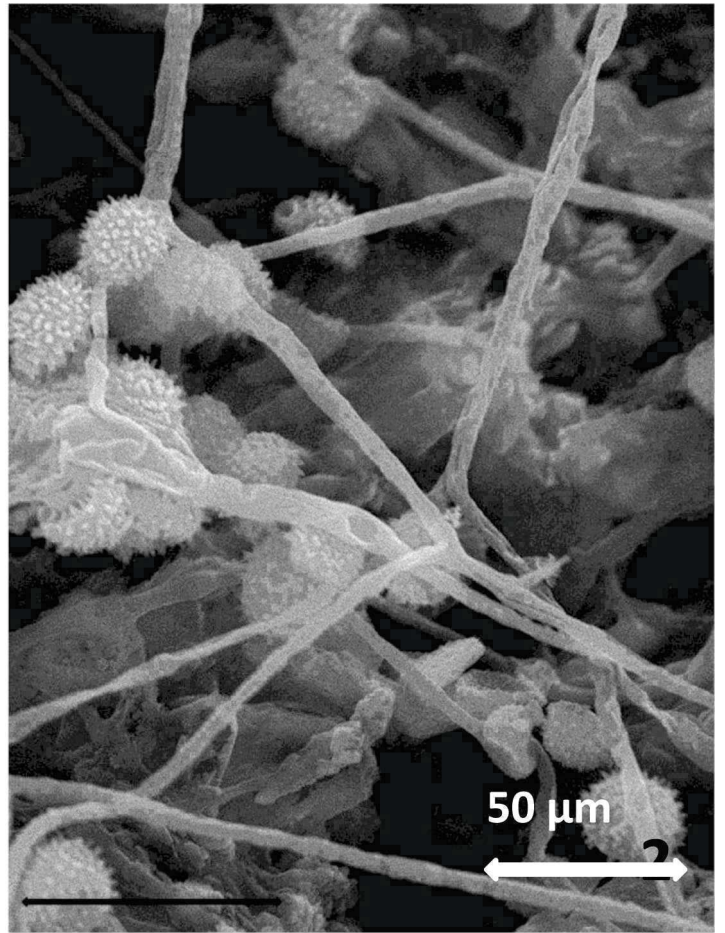
Resultados

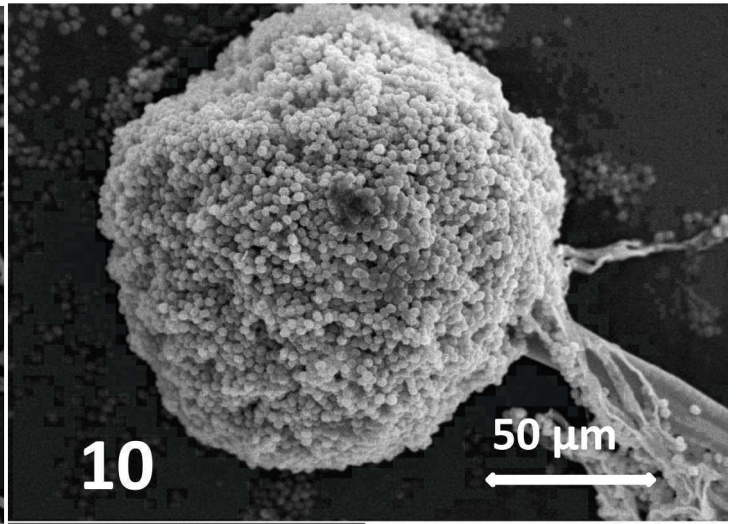
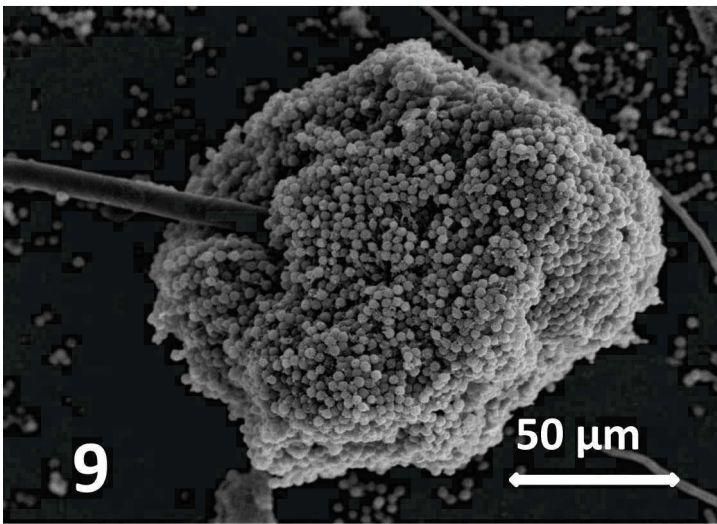
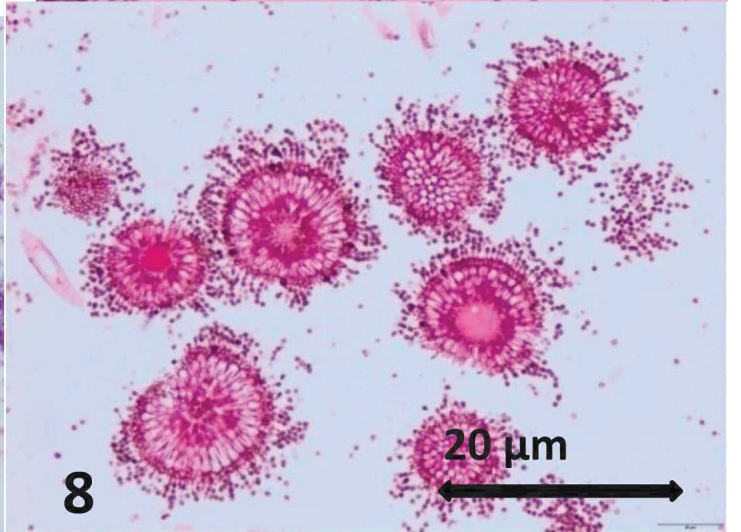
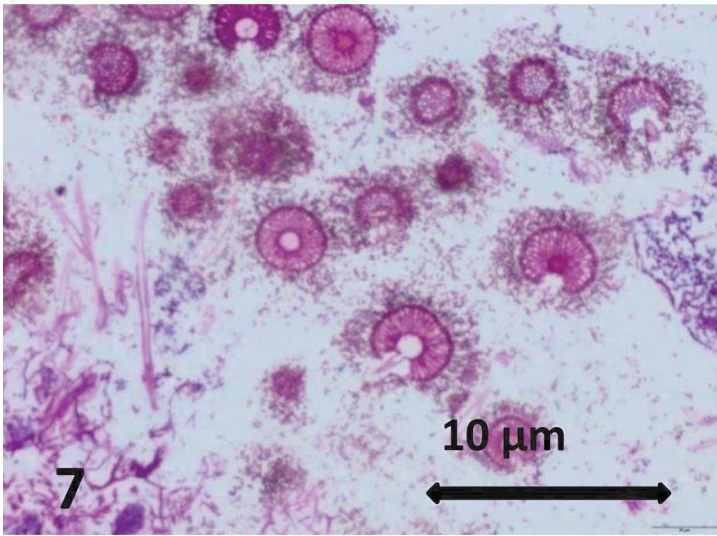
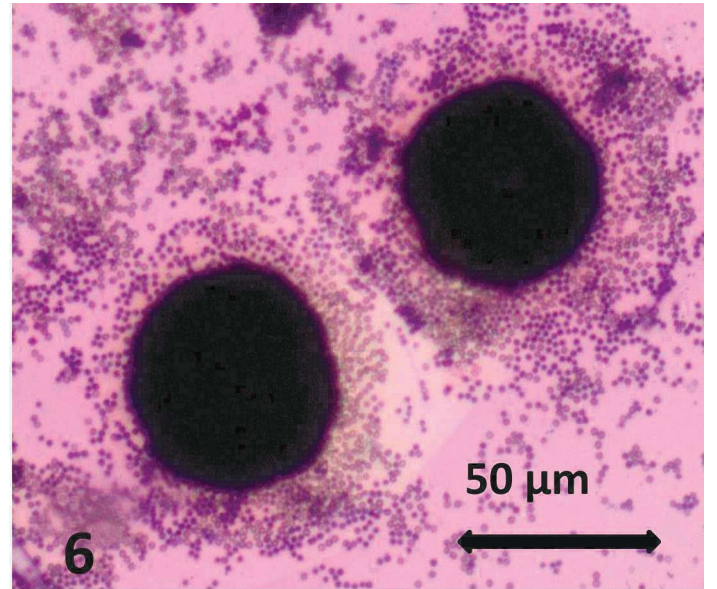
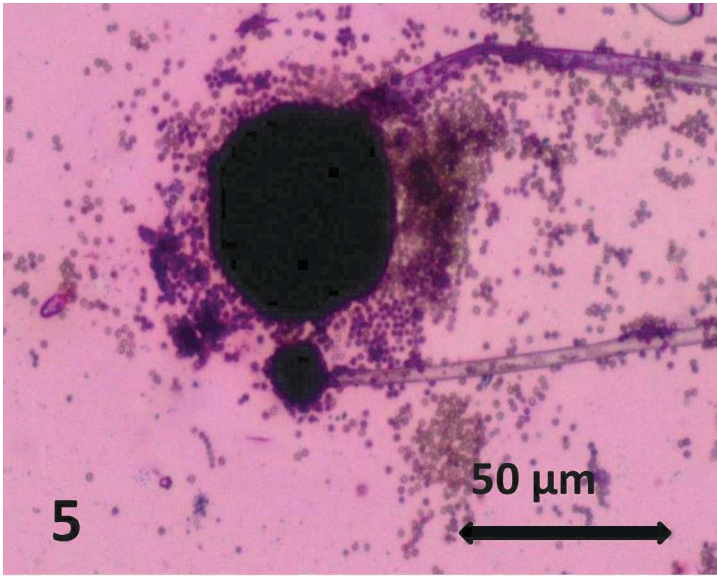
Los conidios junto a las fiálides son los componentes más numerosos de los conidióforos. Sus componentes citoplasmáticos confirman que se trata de células de maduración para la formación de las esporas, por eso, para facilitar la expulsión de las esporas de los conidióforos, los conidios se disponen en hileras de diversa longitud, en las que se aprecia una maduración tanto de núcleo como de citoplasma.

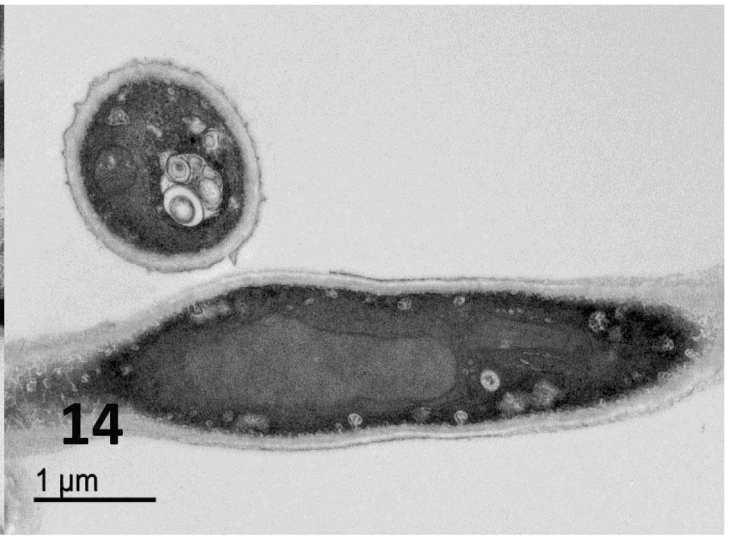
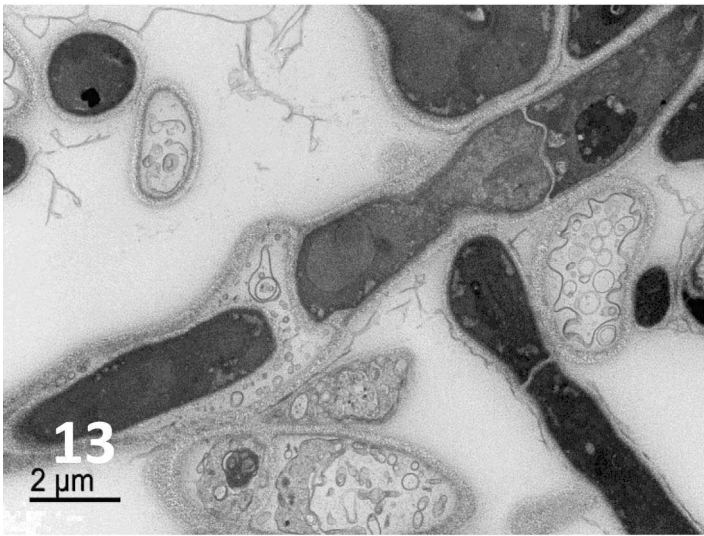
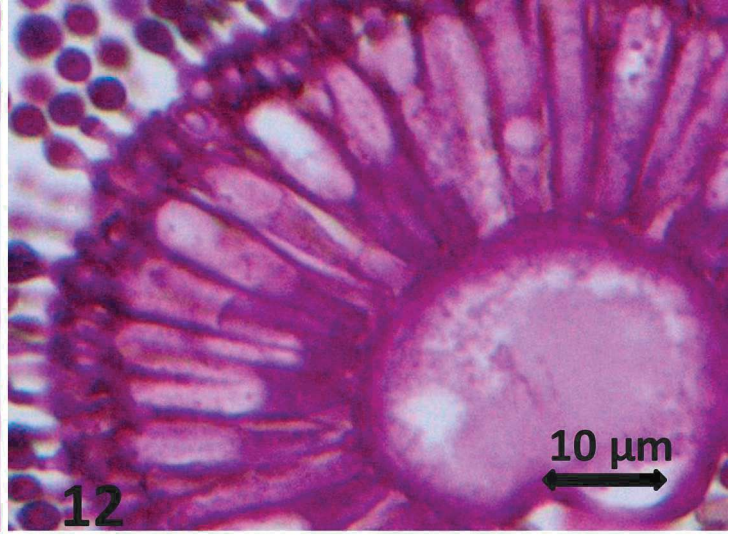
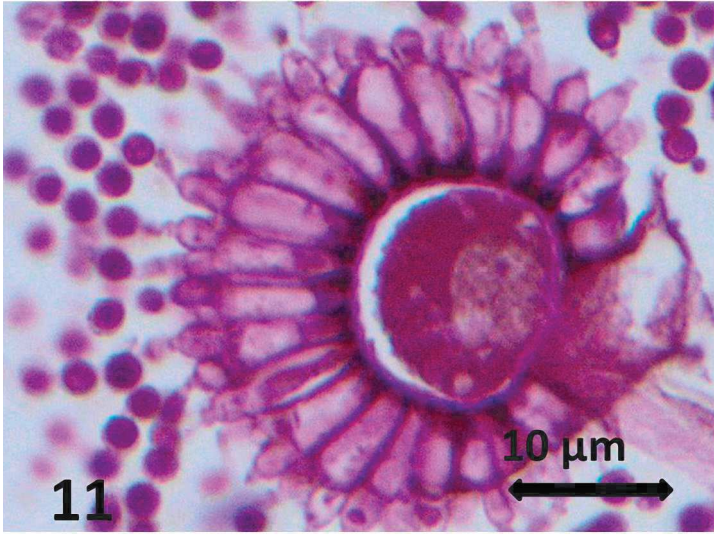
Esporas

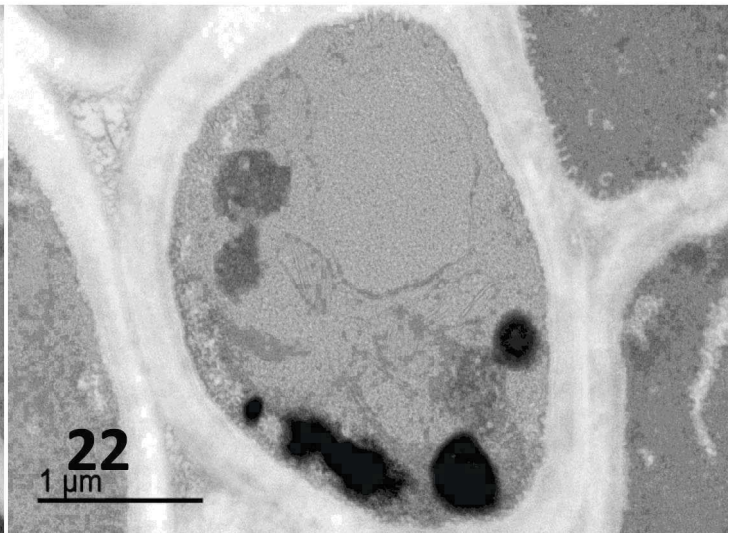
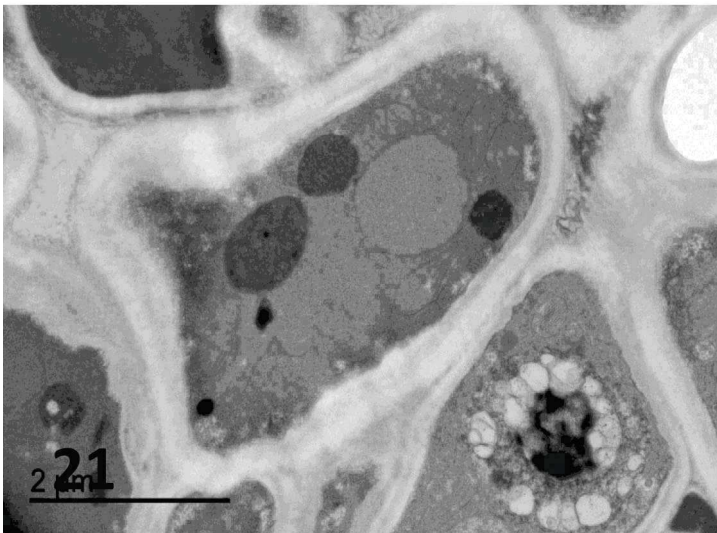
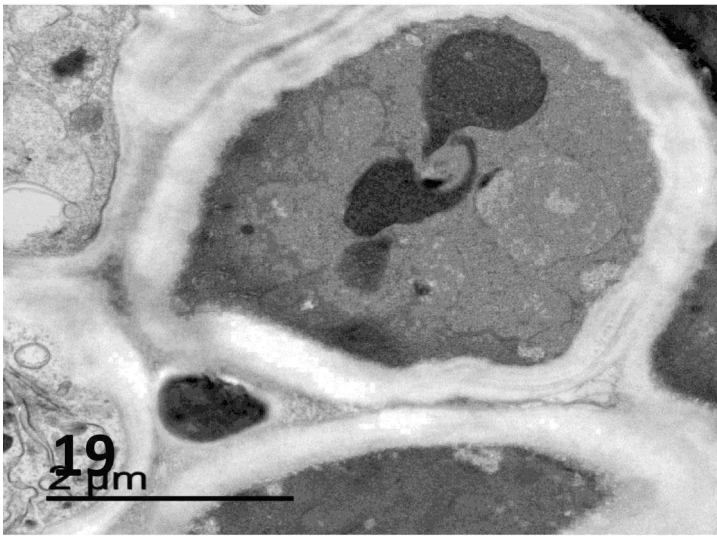
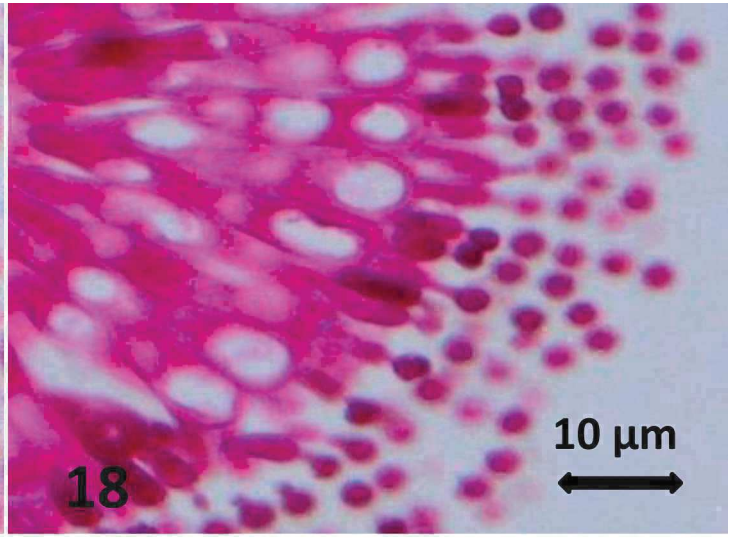
Son muy numerosas, esféricas a ovoides, de superficie espiculada. Están configuradas por dos elementos: el interno que es una célula eucariota que en fases iniciales apenas tiene desarrollo y que finalmente apenas se diferencian sus componentes al tener todos ellos una densidad intensa y de contornos inapreciables, y las cubiertas externas que, si se observan recién formadas, encontramos una interna densa a los electrones y la más externa clara y con espículas externas.

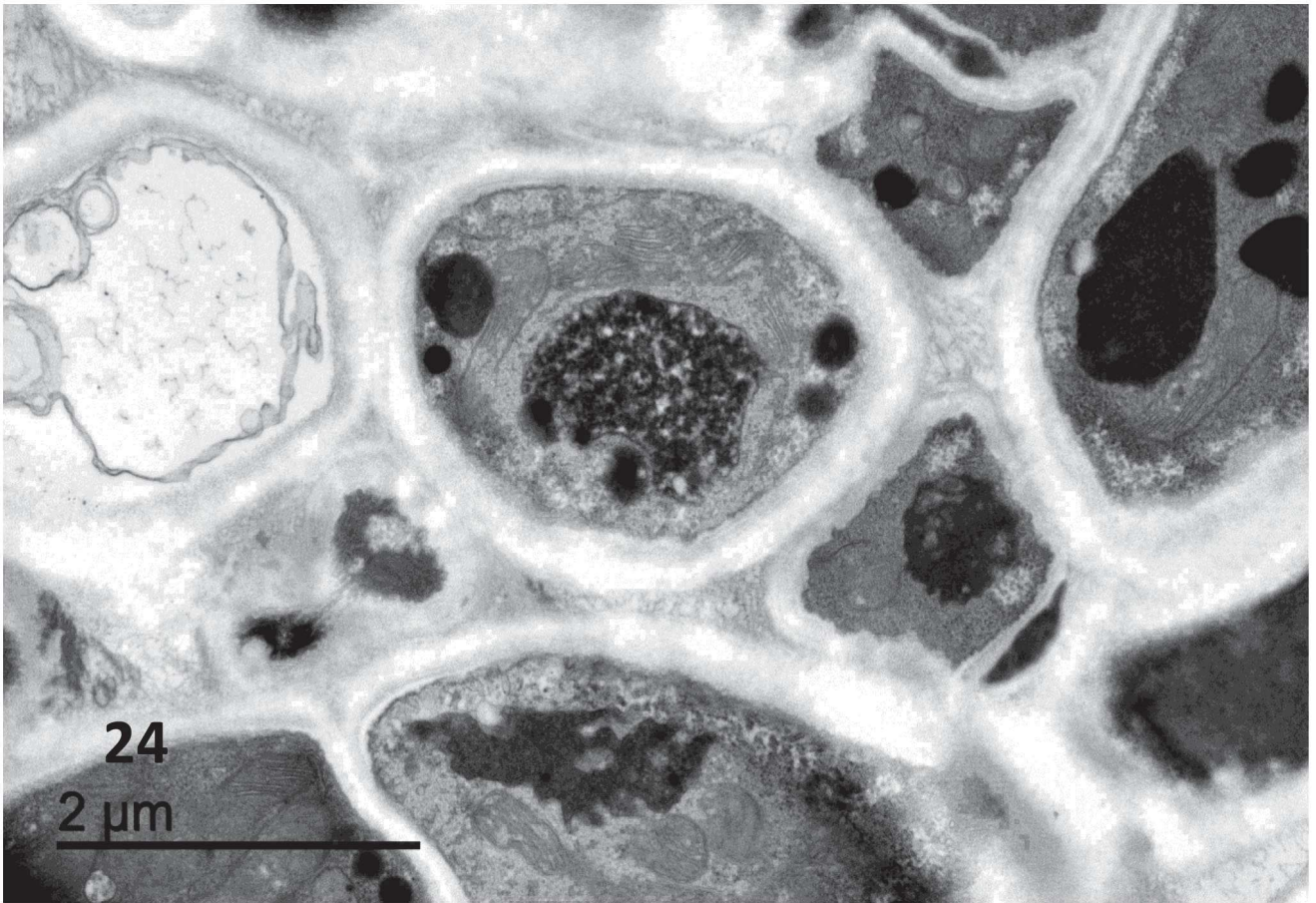
6.- Iconografía

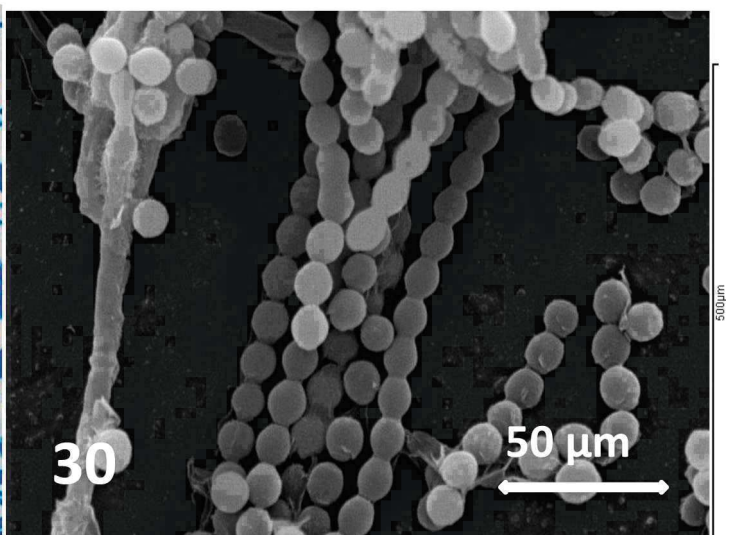
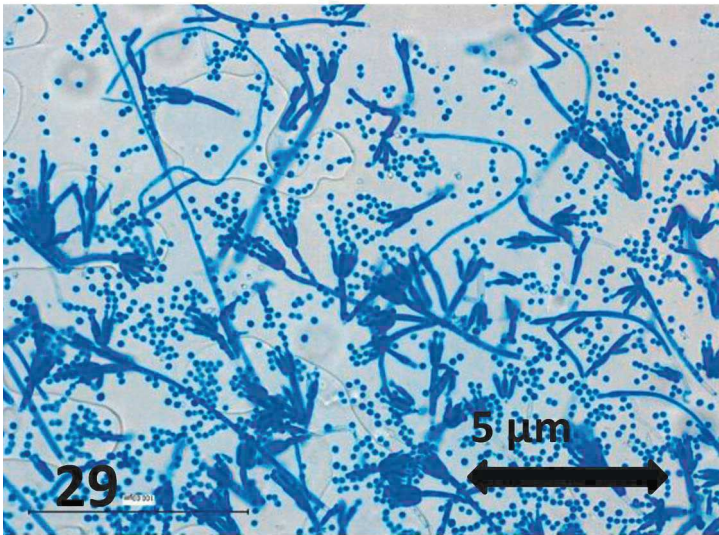
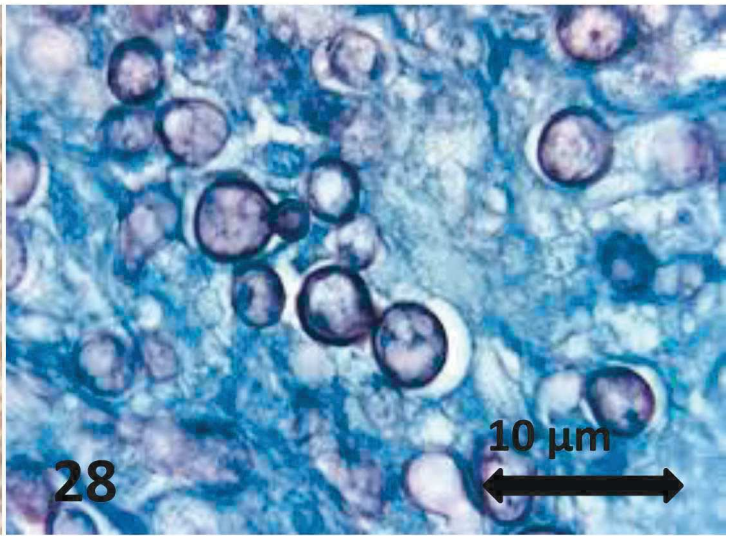


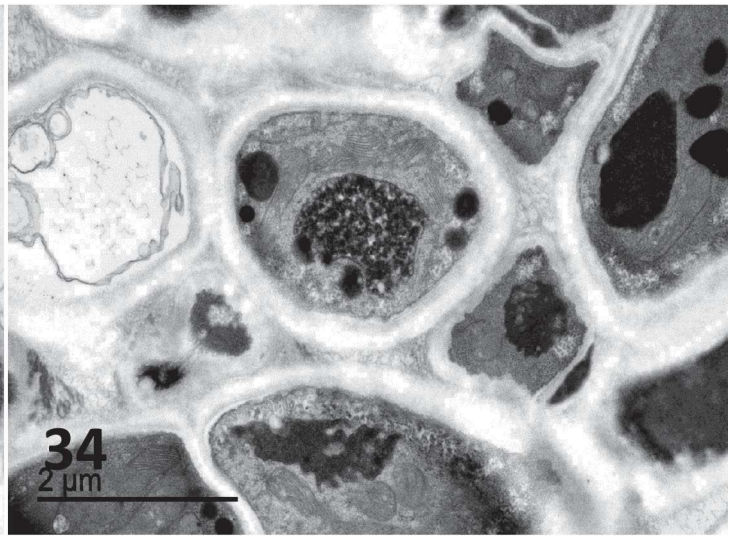
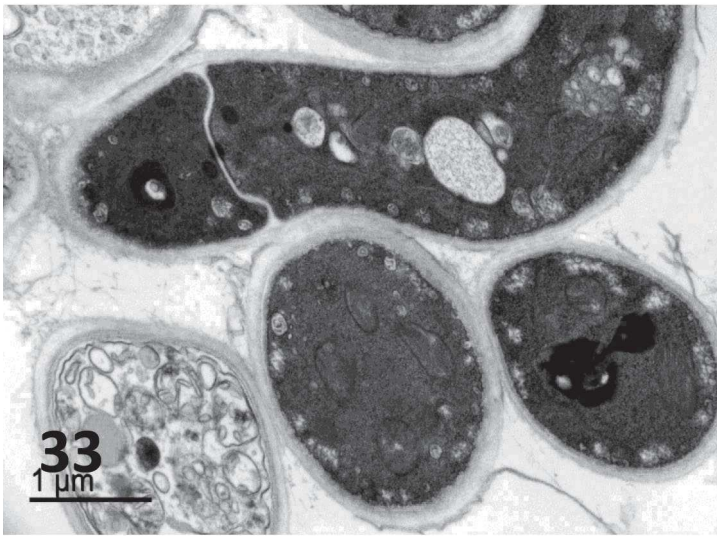
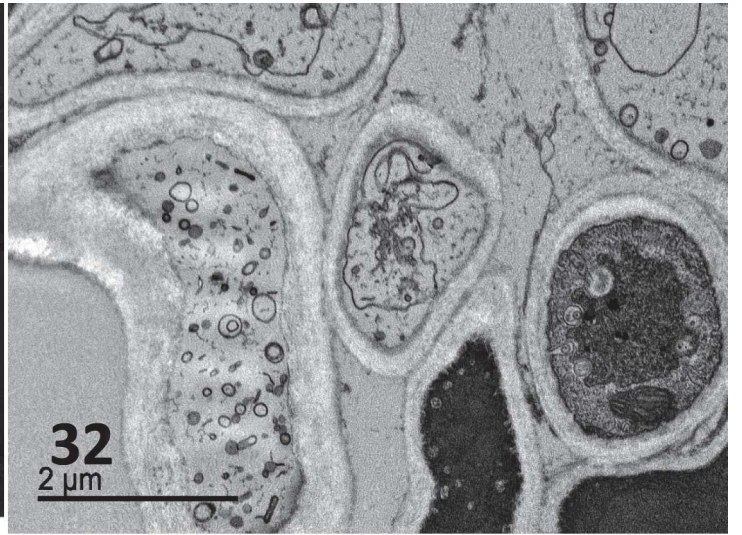
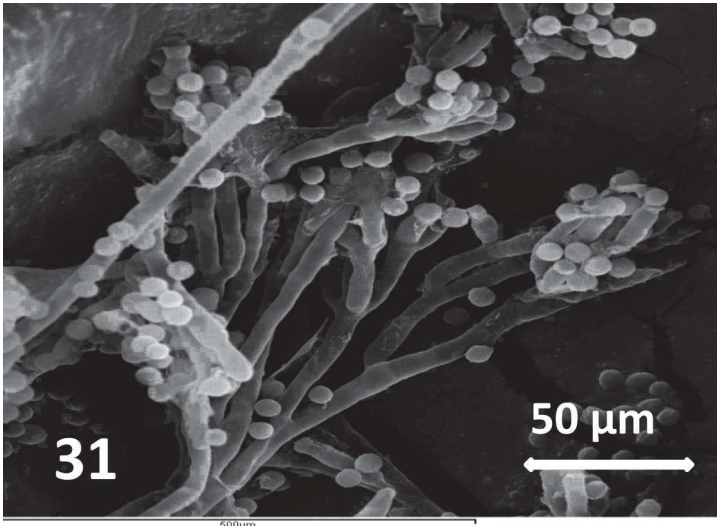


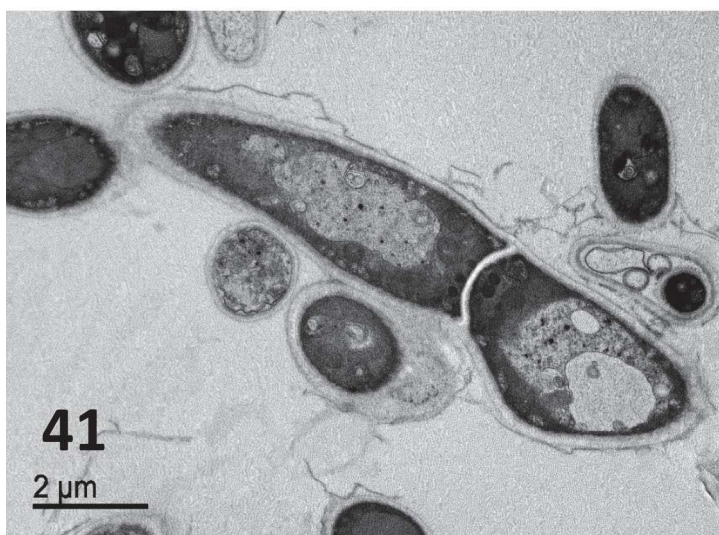
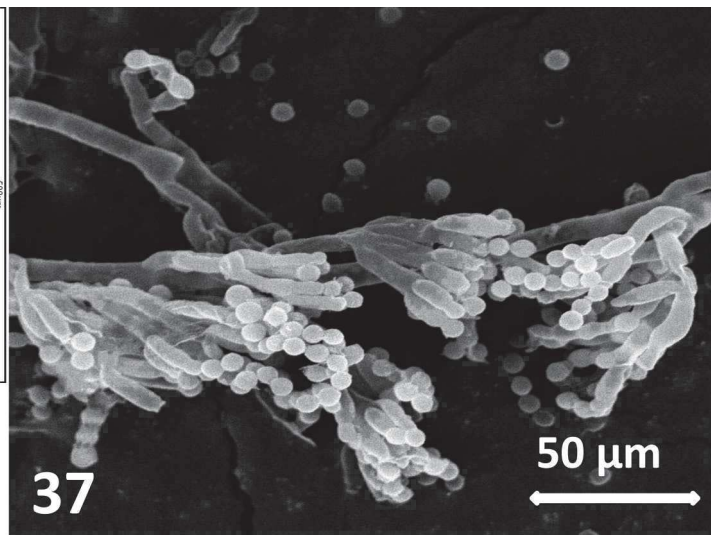












7.- Leyendas de las Imágenes

7. Leyendas imágenes

Imagen 1. Lienzo de cuadro de Valdez Leal.

Imagen 2. Superficie del cuadro, en el que se presentan hifas (H), esporas (E) y polenes (P) al B.E.M. Barra 10 μm .

Imagen 3. Colonias de aspergillus níger de 5 días de cultivo.

Imagen 4. Colonias de aspergillus níger de 10 días de cultivo.

Imagen 5. Impronta de colonias de aspergillus níger, apreciándose conidióforos grandes y pequeños. Barra 10 μm

Imagen 6. Impronta de colonias de aspergillus níger, apreciándose conidióforos grandes y uniformes. Barra 10 μm .

Imagen 7. Detalle al MO de conidióforos muy pleomórficos. Tinción H-E. Barra 10 μm .

Imagen 8. Detalle al MO de conidióforos grandes y uniformes. Tinción H-E. Barra 10 μm .

Imagen 9. Detalle al MEB. Se aprecian cabezas aspergilaespleomórficas

Imagen 10. Detalle a MEB. Se observan abundantes cabezas aspergilaes grandes y uniformes.

Imagen 11. Detalle al MO del primer grupo. Se aprecian las vesículas en la cabeza aspergilar en empalizada. Técnica del P.A.S. Barra 10 μm .

Imagen 12. Detalle al MO del segundo grupo. Se destacan largas vesículas dispuestas en empalizada, con zonas P.A.S. positivas. Barra 10 μm .

Legendas

Imagen 13. Detalle al MET del primer grupo, vesículas alargadas con contenido citoplasmático y zonas amorfas. Barra 10 μm .

Imagen 14. Detalle al MET del segundo grupo, las vesículas alargadas con contenido citoplasmático y apenas zonas amorfas. Barra 10 μm .

Imagen 15. Detalle al MET del primer grupo. Se aprecia una métula, esférica con núcleo central claro rodeado por un pequeño halo de citoplasma en donde se destacan mitocondrias. Barra 10 μm .

Imagen 16. Detalle al MET del segundo grupo. Se observa una métula con núcleo claro y un nucléolo prominente. El halo citoplasmático contiene mitocondrias y gránulos amorfos. Barra 10 μm .

Imagen 17. Detalle al MO de cabeza aspergilar del primer grupo. Se aprecian escasas fiálides pigmentadas. Barra 10 μm .

Imagen 18. Detalle al MO de cabeza aspergilar del segundo grupo. Se aprecian abundantes fiálides pigmentadas. Barra 10 μm .

Imágenes 19. Detalle al MET del primer grupo. Se observan fiálides con un gran núcleo uniforme y denso, con mitocondrias y gránulos proteicos en el citoplasma.

Imágenes 20. Detalle al MET del segundo grupo. Las fiálides muestran su núcleo excéntrico, y tienen en su citoplasma dos tipos de gránulos: unos de poca densidad y los segundos son más numerosos y gran densidad.

Imagen 21. Detalle al MET del primer grupo. Se destacan las fiálides con gránulos proteicos claros y otros de fuerte densidad.

Imagen 22. Detalle al MET del segundo grupo. Las fiálides muestran su núcleo excéntrico y son alargadas, Se destacan claramente dos tipos de gránulos: unos de poca densidad y los segundos son muy numerosos y de gran densidad.

Imagen 23. Detalle al MET del primer grupo, fiálide en fase de división mitótica.

Imagen 24. Detalle al MET del segundo grupo, una fiálide en mitosis, y en su citoplasma se destaca gránulos densos de melanina.

Imagen 25. Detalle de colonia de penicillium cándidum del tercer grupo

Imagen 26. Detalle de cultivo del penicillium cándidum.

.

Imagen 27. Detalle de maderas alteradas del cuarto grupo.

Legendas

Imagen 28. Detalle al MO de las esporas

Imagen 29. Detalle al MO de los hongos de penicillium cándidum del tercer grupo.

Imagen 30. Detalle al MEB de los conidios de los penicillium cándidum de cuarto grupo.

Imagen 31. Detalle al MEB de colonia de penicillium cándidum del tercer grupo-

Imagen 32. Detalle al MET de métulas de penicillium cándidum, del tercer grupo

Imagen 33. Detalle al MET de hifas de penicillium cándidum, del tercer grupo

Imagen 34. Detalle al MET de fiálides en mitosis de los hongos de penicillium cándidum, del tercer grupo.

Imagen 35. Detalle al MET de fiálides de los hongos de penicillium cándidum, del tercer grupo.

Imagen 36. Detalle al MET de esporas de los hongos de penicillium cándidum, del tercer grupo.

Imagen 37. Detalle al MEB de esporas de penicillium cándidum del cuarto grupo.

Imagen 38. Detalle al MET de hifas y de células eucariotas de penicillium cándidum, del cuarto grupo.

Imagen 39. Detalle al MET de fialides y esporas de los hongos de penicillium candidum, del cuarto grupo.

Imagen 40. Detalle al MET de las células eucariotas y esporas de los hongos de penicillium cándidum, del cuarto grupo.

Imagen 41. Detalle al MET de hifas y de células eucariotas de penicillium cándidum, del cuarto grupo

Imagen 42. Detalle al MET de hifas y fiálides de penicillium cándidum, del cuarto grupo

8.- Discusión

8. Discusión

Debido a las escasas descripciones existentes al microscopio electrónico de transmisión (MET) de las células que forman los conidióforos, hemos realizado su estudio de todos los componentes celulares de los *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, con dicha microscopia, por lo que uno de los objetivos del presente trabajo ha sido realizar una descripción de los componentes celulares del *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, identificarlos previamente y realizar un análisis funcional y morfológico entre sus diferentes componentes.

Existen diferentes estudios realizados con el microscopio óptico (MO) y electrónico de barrido (MEB o SEM), en tanto apenas existen identificaciones y descripciones de estos elementos al microscopio electrónico de transmisión (MET) por lo que consideramos que uno de los puntos esenciales de nuestro trabajo son los estudios ultraestructurales, que nos ha permitido conocer su morfología íntima, y comprender su función en el metabolismo general de estos hongos. Por otra parte este trabajo ha permitido no solo conocer los componentes que aislamos de las telas de los cuadros, las esporas e hifas, sino que tras su cultivo nos ha permitido su identificación y conocimiento de su viabilidad y pronóstico para realizar la restauración de los cuadros afectados y esculturas.

Discusión

La identificación y descripción de estos hongos microscópicos los hemos realizado en lienzos de cuadros y maderas de esculturas y destacamos que son similares tanto en su viabilidad como en constitución, por los que los estudios de dichos hongos los hemos realizado conjuntamente.

En nuestras investigaciones se identificaron los *aspergillus níger* y *penicillium cándidum*, y el motivo de realizar sus estudios tanto al microscopio óptico como al electrónico, y sobre todo al MET, es identificar todas las células eucariotas que se forman en los conidióforos y realizar su descripción de la estructura y ultraestructura de dichas células, para su identificación y su posterior comprensión de su funcionalidad.

Lo primero que hemos tenido en cuenta es la viabilidad de estos hongos en las telas de los cuadros alterados, y el hongo que preferentemente predomina es *aspergillus níger*, que se caracteriza por ser uno de los que están más relacionados con la humedad y mantenerse activos en dichas localizaciones.

Tanto al MO como al MEB existen estudios previos que nos han permitido no solo su identificación sino el conocimiento de sus componentes celulares. En tanto que al existir escasos trabajos al MET, y los que existen son incompletos, nuestras descripciones han sido nuestra mayor aportación al conocimiento de estos hongos. El hecho de ser escasos e incompletos los trabajos al MET solo los hemos podido usaren el estudio de algunas de sus células como son los conidios y esporas.

En las imágenes que hemos obtenido de la septación en las hifas hemos podido comprobar al MET que corresponden a las fases de citocinesis de la división mitótica que pueden mantener puntos de unión. Esta septación se evidencia con mayor claridad al MO, debido a que los componentes que forman la célula son muy diferentes al mezclarse zonas donde están los componentes citoplasmáticos con otras que son grandes vacuolas repletas de líquido.

Discusión

Las células correspondientes a las vesículas, que se inician en el cono, se disponen de forma radial y tiene forma alargada, inician la disposición radial del resto de componentes. Estas células tienen una pared rígida y su componente celular es alargado y está rodeado de espacios claros. La existencia de escasas mitosis, con escasos cromosomas, indica que su división mitótica para producir las mótulas (Célula que se encuentra sobre una vesícula y sostiene las fiálides, presente en algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*) es muy rápida.

Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforos, las células eucariotas que tienen mayor actividad funcional son las fiálides. Por una parte el gran número de mitosis que hemos observado indican un aumento en el número de células que posteriormente se transformarán en los conidios y que no solo actúan como una zona germinal sino que, por lo contrario, sus numerosos componentes citoplasmáticos facilitarán la formación de los conidios e incluso dan la coloración negra a las colonias. Dentro de las granulaciones existentes se desprenden dos funciones importantes: en primer lugar los gránulos proteicos claros que tienen una clara función de producir las envueltas de los conidios y posteriormente las esporas, y en esta formación de los gránulos proteicos participa fundamentalmente su retículo rugoso. Y en segundo lugar, los gránulos muy densos corresponden a melanina.

De las descripciones que hemos realizado, tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión, se deduce que la coloración negra de las colonias se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las fiálides pigmentadas. Hemos podido comprobar que en aquellos conidióforos cuyas fiálides contienen más pigmento se traduce en una mayor coloración de las colonias. En las colonias jóvenes en las que su coloración es homogénea y apenas oscura, indica que la melanina es escasa y está distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo macroscópicamente, el aumento del color negro y su disposición central en la colonia parece

Discusión

indicar que los conidióforos tienen un mayor número de fiálides pigmetadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias.

El biodeterioro de un soporte histórico es un fenómeno complejo que implica alteraciones de las propiedades físico-químicas y mecánicas del material por acción de organismos biológicos. A ello hay que añadir las modificaciones del aspecto estético que se producen en los objetos afectados. La intensidad de las alteraciones se produce en función de los componentes de los soportes y de las condiciones ambientales.

Gran parte de las colecciones que se exhiben en los museos son de naturaleza orgánica, caracterizándose por su alta higroscopicidad. Ello implica un significativo incremento del contenido de humedad del soporte, especialmente cuando los objetos son expuestos a una insuficiente ventilación y a una humedad relativa superior al 65%. Bajo estas condiciones numerosos materiales quedan expuestos al desarrollo de especies de microorganismos. A esta problemática, se une frecuentemente la presencia de insectos que pueden contribuir a la pérdida irreparable de piezas históricas en un breve periodo de tiempo.

Desde el punto de vista evolutivo, los hongos son organismos más desarrollados que las bacterias. Son estructuras normalmente pluricelulares con un metabolismo complejo. Poseen filamentos llamados hifas que forman el micelio o cuerpo vegetativo. Se desarrollan fácilmente a un pH entre 4-6, humedades relativas superiores a 70 % y temperaturas entre 25-30°C. Las oscilaciones de los parámetros microclimáticos pueden favorecer el desarrollo de las esporas fúngicas. Los hongos al igual que muchas especies bacterianas producen manchas de diferentes tonalidades como resultado de los productos que excretan. Entre ellos, se reconocen enzimas tales como la celulasa o diferentes tipos de proteasas y ácidos orgánicos (oxálico, fumárico, acético, láctico, glucónico, glucurónico, etc), los cuales se depositan sobre el soporte modificando sus propiedades químicas y como consecuencia, deteriorándolo

Discusión

La actividad de las diferentes especies de hongos y bacterias se ve favorecida por multitud de factores que incluyen: la humedad relativa, las fluctuaciones de la temperatura, la luz, la naturaleza de los nutrientes del soporte, el contenido de humedad del mismo, las propiedades físicas de la superficie del objeto, el mecanismo de absorción-emisión de la humedad del material, el pH, la presencia de polvo, el movimiento del aire ambiental y su grado de penetración en el objeto, y las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera.

El contenido de humedad en un material es uno de los factores más importantes en el crecimiento microbiano que determina la cantidad de agua presente para la germinación de las esporas microbianas. Muchas especies de hongos y bacterias comienzan su desarrollo en función del contenido de humedad sobre la superficie de un objeto. Asimismo, ha de tenerse en cuenta que los microorganismos, durante su desarrollo, producen agua metabólica, la cual incrementa el contenido en humedad de un material, favoreciendo a su vez la multiplicación celular.

Para prevenir el biodeterioro, no es conveniente reducir excesivamente el grado de humedad relativa del medio ambiente. A modo de ejemplo, puede citarse que Erhardt (1994), estudió el efecto de la HR ambiental sobre el deterioro químico de un material celulósico como el papel, y demostró que el grado de hidrólisis de este soporte, se minimiza al reducir la HR. Sin embargo, a baja HR, puede dar comienzo la reticulación o entrecruzamiento de las cadenas de celulosa, fenómeno éste que se produce al eliminarse el agua interfibrilar. Para evitar este fenómeno, Erhardt recomendó una HR entre el 25 - 50 % como rango óptimo para la conservación del papel.

8.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS

El agar Sabouraud es un medio de cultivo que por sus características funciona como medio de enriquecimiento para hongos y que en caso de contener cloranfenicol u otro antibiótico se convierte en un medio selectivo para los mismos (Schuster E, N Dunn-

Discusión

Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). El medio contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos sobre las bacterias. Es utilizado para el cultivo de hongos, especialmente dermatofitos, aunque también pueden desarrollarse en él cierto tipo de bacterias filamentosas tales como Nocardia.

Fue utilizado por primera vez por Raymond Sabouraud en 1892. Más tarde Chester W. Emmons mejoró el medio acercando el pH al neutro (pH entre 5,5 y 6,0) y disminuyendo el nivel de glucosa para permitir el crecimiento de otros subcultivos de hongos.

Sabouraud Glucose Agar es un medio de uso general para el cultivo de dermatofitos. Hoy en día se utiliza para el aislamiento y cultivo de todos los hongos. Las peptonas en Sabouraud Glucose Agar son fuentes de factores de crecimiento nitrogenoso (Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS MeorHussin, 2016) .La glucosa aporta una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. La alta concentración de glucosa presenta una ventaja para el crecimiento de hongos (estables osmóticamente), mientras que la mayoría de las bacterias no tolera la alta concentración de azúcar. Además, el bajo pH es óptimo para los hongos pero no para muchas bacterias. Sabouraud Glucose Agar es sólo levemente selectivo frente a las bacterias.

Son medios selectivos para el aislamiento de hongos a partir de muestras clínicas y no clínicas. Se han añadido agentes selectivos para inhibir las bacterias. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que inhibe una amplia variedad de bacterias gram negativas y gram positivas, pero puede tener un efecto inhibitorio en numerosos hongos patógenos. Se ha demostrado que los antimicrobianos como la penicilina, la gentamicina y la estreptomycinina, o una combinación de las mismas, son eficaces en la inhibición de bacterias sin afectar el crecimiento fúngico 2-5. Estos medios se utilizan para el aislamiento de hongos a partir de muestras clínicas o materiales en los que se sospeche la presencia de contaminantes bacterianos. Sabouraud

Discusión

Glucose Agar es uno de los medios utilizados en las pruebas de límites microbianos en USP y EP. (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002).

Después de una incubación suficiente, las placas pueden: mostrar colonias aisladas en las áreas extendidas y crecimiento confluyente en áreas de inoculación densa, examinar la posible presencia de colonias fúngicas con color y morfología habituales en las placas y realizar pruebas bioquímicas y procedimientos microscópicos y serológicos para confirmar los resultados.

El agar Sabouraud con glucosa es un medio de amplia utilización y parcialmente selectivo para hongos tipo *penicillium cándidum*, debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa. Dado que muchas bacterias toleran el bajo pH y la alta concentración de glucosa y crecen en agar Sabouraud, en especial durante incubación prolongada a menudo necesaria para el aislamiento de hongos, se han desarrollado numerosas fórmulas con inhibidores antibacterianos (Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS MeorHussin, 2016). Se ha demostrado que los antimicrobianos tales como penicilina, cloranfenicol, aminoglucósidos o combinaciones de los mismos son efectivos para inhibir bacterias sin afectar el crecimiento de los hongos¹⁻⁶. En Sabouraud GC Agar las peptonas son fuente de nitrógeno. La glucosa (=dextrosa) es una fuente de energía para el crecimiento de los hongos. El cloranfenicol y la gentamicina son antibióticos de amplio espectro que inhiben una amplia variedad de bacterias gram negativas y gram positivas.

Los medios con cloranfenicol, como, BD Mycosel Agar (agar Mycosel BD) son usados para los cultivos de los *aspergillus*, (y se destaca el BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol and Cycloheximide) (agar Sabouraud BD con cloranfenicol y cicloheximida) y son medios altamente selectivos para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras con gran cantidad de flora de otros hongos y bacterias. No son medios de uso general para el aislamiento

Discusión

de todos los hongos (incluidos mohos y levaduras saprofitas), (Loudon KW, APCoke, JP Burnie, AJShaw, BA Oppenheim, CQ Morris, 1996).

8.2. USO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS PARA LA RECUPERACIÓN DE OBRAS DE ARTE

El uso de sustancias fundamentalmente químicas, tanto en lienzos como en maderas, para la recuperación de las obras de arte resulta a veces sumamente peligrosa, por lo que es de interés conocer estos tipos de productos.

Dentro de los métodos de desinfección y desinsectación de bienes culturales, se han venido aplicando numerosos procedimientos. El más común de ellos ha sido la fumigación en cámaras con óxido de etileno (Van de Vondervoort P, B Poulsen, G Ruijter, T Schuleit, J Visser, JIversen, 2004). Este producto puede provocar reacciones químicas que inducen a deterioros significativos. Puede reaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, y con los carbonilos e hidroxilos de las celulosas, ocasionando alteraciones de las estructuras de los polímeros. También reacciona con compuestos metálicos, especialmente con el cobre. Todo ello produce cambios en las propiedades físicas y químicas de los soportes tratados. Además, es un producto altamente tóxico.

El timol es un producto más accesible que se ha venido utilizando habitualmente en forma cristalina como sólido sublimable. Varios estudios indican que no elimina las esporas de hongos ni las células bacterianas. Puede ocasionar alergias e irritación en las vías respiratorias. Se le atribuyen efectos cancerígenos.

Otros químicos como el ortofenilfenol (OFF), tienen un amplio espectro como fungicida y bactericida. El OFF se ha utilizado ampliamente como biocida aplicado a bienes culturales. También se ha incorporado a productos de restauración, adhesivos sintéticos y colas animales. Puede despolimerizar algunos adhesivos (Van de Vondervoort P, B Poulsen, G Ruijter, T Schuleit, J Visser, JIversen, 2004). Deteriora los textiles y el papel produciendo cambios de color

Discusión

y envejecimiento de los materiales. No obstante, su toxicidad es menor que la de otros fungicidas incluyendo el pentaclorofenol. Es soluble en etanol. La sal sódica del ortofenilfenol es soluble en agua y presenta mayor grado de toxicidad que el ortofenilfenol.

El formaldehído, se ha aplicado frecuentemente por nebulización, tiene un poder de penetración escaso. Tiene un efecto fungicida limitado y no tiene eficacia como insecticida. Es un buen fijativo del material celular, por ello se considera muy tóxico. Tiene efectos cancerígenos (Van de Vondervoort P, B Poulsen, G Ruijter, T Schuleit, J Visser, JIversen, 2004).

Los tratamientos tóxicos que se utilizan para erradicar insectos abarcan dos tipos de productos: los que actúan por contacto o los fumigantes. Suelen diferenciarse en que los de contacto son sustancias sólidas o líquidas y los fumigantes suelen ser gases o sólidos que sublimen rápidamente. Sobre todo éstos últimos han sufrido un gran desarrollo durante este siglo por lo espectacular de sus resultados (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck. 2002). Debido a que en su origen la mayoría fueron concebidos para eliminar plagas agrícolas o insectos vectores de enfermedades son sustancias muy tóxicas, tanto para las plagas como para casi cualquier forma de vida, incluyendo los humanos. Por este motivo deben manejarse con sumo cuidado y utilizarse de forma racional por personal experimentado y no de forma indiscriminada.

La toxicidad para el hombre de estos productos suele quedar enmascarada si se respetan los umbrales de utilización. Los efectos a corto plazo no son apreciables, pero todos o casi todos representan un grave riesgo para la salud a medio y largo plazo. La mayoría se han identificado como agentes carcinógenos, teratógenos o productores de enfermedades crónicas debido a su acumulación en el organismo (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). Este es el caso de gran parte de los fumigantes como el óxido de etileno y el bromuro de metilo entre otros.

Discusión

En el Boletín Oficial del Estado número 20 del día 24 de enero de 1984, se establecen, para las sustancias utilizadas como pesticidas, las siguientes categorías:

- De baja peligrosidad (◇).- los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables. (Naftaleno, piretrinas, paradiclorobenceno).

- Nocivos (◇◇).- los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada. (Bendiocarbano).

- Tóxicos (◇◇◇).- los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos e incluso la muerte. (Diclorvos, lindano).

- Muy tóxicos (◇◇◇◇).- los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea pueden entrañar riesgos extremadamente graves agudos o crónicos e incluso la muerte. (Bromuro de metilo, fosfina, óxido de etileno).

No obstante, existen técnicas alternativas a los tratamientos con productos tóxicos entre las que se incluyen los métodos térmicos, las feromonas, microondas y atmósferas transformadas entre otros.

Los hongos se caracterizan por su ubicuidad y abundancia, jugando un papel importante en los procesos de descomposición de la materia orgánica, de la cual consiguen energía. Las hifas a través de sus paredes secretan enzimas que descomponen proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, causando la desintegración de la materia que utilizan (Pelczar y Capella, 1990). Muchos de ellos pueden colonizar y aprovechar materiales de construcción de edificios, monumentos, obras de arte y objetos elaborados con distintos tipos de componentes (papel, madera, vidrio, cerámica, etc.), ocasionando un cambio indeseable en las propiedades del material (Fugikawa et al., 1997; Bigourdan et al., 1999; Gómez, 2000). Este proceso se conoce como biodeterioro (Villalba et al., 2004), que en centros de documentación puede conducir a la pérdida parcial o total de información. La degradación del papel involucra la descomposición de tintas orgánicas y aditivos (encolantes, abrillantadores ópticos), apresto (almidón o proteína) y

Discusión

revestimientos, además de las fibras de celulosa. El desarrollo fúngico en el papel está regulado por las condiciones de temperatura y humedad del sitio de almacenamiento. Según Valentin (1999) los hongos prosperan en condiciones de temperatura de 14 °C a 35 °C y sobreviven por debajo de 0 °C. Valores de pH 6 generan medios propicios para el crecimiento de los hongos, lo mismo que una humedad relativa superior a 65%.

Los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* son los de mayor frecuencia en la colonización y aprovechamiento de los soportes de papel y están estrechamente relacionados con las condiciones ambientales, por lo que las medidas preventivas y de control contra el biodeterioro se deben hacer verificando, principalmente, esas poblaciones. Soluciones de cloruro de dimetil–benzil–amonio se han empleado con éxito para la limpieza de la atmósfera contaminada por los hongos (Calvo, 1997). Los resultados de estudios indican que una solución de [tiabendazol (tiazolil–4) –2 benzimidazol] aplicado en un 10% por nebulización térmica, a una tasa de 5 mL/m³, permite obtener el efectivo saneamiento de la atmósfera al mismo tiempo que actúan sobre las esporas depositadas sobre las superficies (Rakotonirainy et al., 1999). El empleo de técnicas microbiológicas que permitan aislar los hongos presentes en diferentes bibliotecas es fundamental para desarrollar programas de control y prevención, en el biodeterioro del material bibliográfico (Cunha, 1995).

En la sección de Depósito General los factores con mayor relevancia en el biodeterioro corresponden a la escasa ventilación, la falta de limpieza y la ausencia de un sistema de control de humedad, ocasionando incrementos en la temperatura hasta los 28.8 °C y humedad relativa hasta el 62.2%. Todos estos factores favorecen la acumulación de esporas ambientales y la colonización de hongos en algunos de los materiales de lectura. Sin embargo, las diferencias se dieron puntualmente en el número de UFC de hongos celulolíticos presentes en el ambiente.

Todos los géneros de hongos aislados presentaron la capacidad para crecer en menor o mayor medida en el agar celulosa, de los 17 géneros identificados

Discusión

8.3. DESCRIPCIÓN PENICILLIUM SPP.

Éste es un hongo filamentoso productor de las penicilinas, un grupo de antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). *Penicillium* es un amplio género de hongos, que se encuentran habitualmente en los suelos, son de crecimiento rápido por lo que algunos contaminan alimentos y frutas. *Penicillium marneffii* es el único patógeno para el hombre y animales, además es la única especie de este género identificada como dimórfica, la cual produce una micosis que afecta al sistema retículo endotelial.

Es un género de hongos conocidos como mohos verdes o azules; de algunas especies se obtiene la penicilina. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos (Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz, 1985). La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos. Éstos son ramificados y en forma de abanico.

8.3.1. Descripción micológica.

Hongo filamentoso que presenta conidióforos tabicados de pared lisa (200-300 μm), ramificado al final, con métulas (de 8-12 μm) y fiálides en forma de botella (de 7-12 μm), donde nacen conidios lisos, elipsoidales (de 2,5-4 μm) azules o verde-azulados en cadenas, sin ramificar, con un penacho o pincel característico. Colonias de crecimiento rápido, vellosas, aterciopeladas, verdosas con una corona radial ancha y blanca, a 25 C° (no crecen o crecen pobremente a 37 C°). Puede haber gotas de exudado sobre la superficie de la colonia. Reverso habitualmente amarillento o cremoso. Esporulación abundante. Olor aromático, especiado o afrutado (a manzana o a piña).

8.3.2. Hábitat.

Discusión

El *Penicillium* es un género grande y encontrado casi por todas partes, siendo comúnmente el género de hongos más abundante en suelos. La fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema (Herrera, M.M, Molina, A., Blanco, A., 2017). Algunas especies producen toxinas y pueden hacer el alimento no comestible o aún peligroso. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. Es una buena práctica desechar los alimentos que demuestran el desarrollo de cualquier moho. Se encuentra con frecuencia en los edificios húmedos y mohosos donde deteriora diferentes materiales de construcción, entre los que resaltan el papel de decoración (crece bien en la cola empleada para su adhesión a las paredes).

8.3.3. Reproducción.

La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos (Herrera, M.M, Molina, A., Blanco, A., 2017). Éstos son ramificados y en forma de abanico. Los órganos sexuales son gametangios arrollados en hélice. El podrido producido por *Penicillium* es el más conocido. Son los clásicos mohos verde y azul. Ninguno de dichos patógenos puede atacar a la fruta si no tiene heridas en su superficie y difícilmente se propagan por contacto si los frutos no presentan lesiones en su corteza.

8.3.4. Características.

Los *Penicillium* son hongos filamentosos incoloros. Todas las especies del género *Penicillium* comparten una característica que hace que sean fáciles de reconocer. Su forma reproductiva asexual, los conidióforos, crecen formando un denso cepillo como un cojinete (Herrera, M.M, Molina, A., Blanco, A., 2017). Los *penicillium* generan conidios, un tipo de espora caracterizada por formarse directamente en la hifa. El conidióforo, la parte vegetativa del cuerpo fructífero se ramificará dando lugar a

Discusión

la métula, un tipo celular intermedio. En el extremo de la métula aparece un tipo celular con forma de botella, llamado fiálide. La ramificación de los conidióforos, el número de métulas y las fiálides que aparecen en el extremo de cada conidióforo, se utiliza como carácter distintivo para la diferenciación de las especies del género. En el extremo de las fiálides es donde crecerán las ascosporas, una o varias, una encima de otras. Las esporas más pegadas a la fiálide son las más jóvenes y las más alejadas son las más viejas y se acaban soltando para dispersar el hongo. Por lo general tan solo las esporas tienen color y éste es normalmente verde. No todas las especies del género sintetizan penicilina, aunque sí la mayoría.

8.3.5. Distribución y hábitat.

El género es ubicuo, y muy fácil de aislar del suelo. Aunque también están presentes sus esporas en el aire (Herrera, M.M, Molina, A., Blanco, A., 2017). No necesitan mucha humedad para crecer, por lo que pueden hacerlo con muy poca materia, siendo junto con el género *Aspergillus* el género cuyas esporas prevalecen más tiempo en el aire dentro de las casas. Algunas de sus especies pueden afectar a los lubricantes y a la maquinaria, puesto que pueden obtener energía del lubricante.

8.3.6. Interacción con el ser humano.

Varias especies de este género juegan un papel clave en la producción de queso (como el camembert o el brie) y alimentos madurados de base cárnica (como el jamón curado o los embutidos) donde estos hongos protegen al alimento de la invasión de otros hongos no deseados, por liberar micotoxinas. Incluso se ha observado que contribuyen tanto al sabor como al olor y a la textura del embutido.

No todos los mohos son iguales. Unos son perjudiciales y tóxicos, algunos desarrollan un papel fundamental en la producción de ciertos quesos, a los que ayudan en el proceso de maduración y curación. Estos mohos aportan sabor y aroma al

Discusión

roquefort, cabrales, brie, camembert o gorgonzola, que deben su sabor a una variedad de *Penicillium*. En 1928, Alexander Fleming descubrió, de manera accidental, las propiedades germicidas del moho verde, llamado *Penicillium notatum*, una especie que mataba las bacterias pero que no tenía efectos perjudiciales para personas y animales. Por otro lado, diferentes especies de *Aspergillus* se utilizan para fermentar la salsa de soja y producir ácido cítrico o ácido glucónico, y *Saccharomyces cerevisiae* se usa para hacer pan, cerveza y vino.

Estos aparecen en forma de manchas verdes. Muchos están provocados por *Penicillium digitatum* que, en la cáscara de los cítricos, aparecen con sus características esporas verdeazuladas. Se desarrolla sobre todo a temperaturas de unos 20 °C y humedad alta, y suele introducirse en la fruta a través de heridas. Este tipo de mohos son grandes expertos de la reproducción (Herrera, M.M, Molina, A., Blanco, A., 2017). En el caso del que afecta al pan, *Rhizopusstolonifer*, este se percibe porque aparecen puntitos negros que se llaman esporangios, es decir, cápsulas con esporas. A medida que los mohos crecen, se forman esporas, pequeñas partículas visibles que le confieren el color verdoso, blanco o grisáceo al alimento. Esto es sinónimo de que los mohos han penetrado muy en el interior del alimento. Estos alimentos no son aptos para el consumo.

8.3.7. Control y prevención.

Para minimizar el crecimiento de este tipo de hongos en los alimentos, la limpieza es fundamental. Las esporas pueden acumularse en la heladera, los trapos de cocina y otros utensilios de cocina, por tanto, es muy importante mantenerlos limpios y secos. Las micotoxinas suelen crecer en ambientes con temperaturas templadas (entre los 24 y 28 °C) y con una tasa de humedad elevada. En el ámbito doméstico, la prevención pasa por establecer condiciones de almacenamiento óptimas: buena

Discusión

ventilación, temperatura y humedad, y seguir unas correctas condiciones de higiene durante la preparación de alimentos (Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton, 2004). Otro consejo es comprar solo lo necesario para consumir, según datos de la OMS estamos tirando 1/3 de la comida que comemos. Si compramos lo justo, no se arruina la comida, y evitamos riesgos innecesarios, tirar el dinero y desperdiciar alimentos.

8.4. ASPERGILLUS

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota (Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung, 1998). Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*Aspergillus flavus*), negro (*Aspergillus niger*), marrón (*Aspergillus terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. *Aspergillus* es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung, 1998).

Viabilidad, propagación y transmisión. Reservorio Suelo, vegetales (en descomposición).

Hospedadores: Humanos, bovinos, equinos, aves, cetáceos.

Dosis infectiva mínima (DIM) Se desconoce en la actualidad.

Discusión

Supervivencia ambiental. Crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición. Es un contaminante habitual de los conductos de climatización-ventilación. Es termotolerante, puede vivir entre los 12°C y los 57°C.

La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios que se encuentran presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria (Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal, 2015). También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas y la aparición de efectos tóxicos por ingestión de alimentos contaminados. Son responsables de casos de enfermedad nosocomial. No se produce transmisión de persona a persona.

8.4.1. El Aspergillus Níger.

Aspergillus níger es un hongo que produce un moho negro en vegetales, muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón (Jacobson ES., 2000). Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus*.

En 1729 lo catalogó por primera vez el biólogo italiano Micheli. Y su hábitat natural es el heno y el compostaje.

El *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 hongos. Puede existir en dos formas básicas: levaduras e hifas (Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage, 1997). El *Aspergillus* es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuesto a las levaduras, que se componen de una sola célula redonda).

De estudios en medios sólidos se ha observado que los valores promedio de la longitud y del diámetro de las hifas distales varían en relación inversa con la concentración inicial de glucosa (Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser, 1991). La red metabólica publicada para *Aspergillus niger*, está constituida por 1190 reacciones

Discusión

y 1045 metabolitos, distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial sin embargo, es realmente imposible poder medir simultáneamente a todas estas especies o conocer en detalle el funcionamiento regulatorio de las diversas enzimas.

Investigadores de la Universidad tecnológica del centro de Veracruz determinaron que el *Aspergillus niger* encontrado en los suelos puede emplearse para favorecer el desarrollo de distintos cultivos, esto debido a una pequeña porción del fósforo que contiene.

El *Aspergillus Níger* es una especie de hongo inocuo para los seres humanos y también para la mayoría de los cultivos (Jacobson ES., 2000). Los compuestos químicos naturales del fósforo son poco saludables. Sin embargo, en el caso de los vegetales, son un nutriente esencial.

Investigaciones recientes de la Universidad Nacional de la Plata en ensayos con plantas de tomate, para comprobar si los vegetales pueden absorber el fósforo que libera, y con un modelo estructurado que predice cualitativamente el crecimiento en un sustrato sólido cuando se utilizan diferentes fuentes de carbono, demostraron que los vegetales pueden absorber el fósforo que libera *Aspergillus Níger*. Y los resultados fueron concluyentes: las plantas cultivadas en macetas en las que se añadió hidroxiapatita y esporas del hongo crecieron tanto como la testigo que habían recibido fósforo con el riego (Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser, 1991). Por el contrario, en los lotes restantes (a uno de los cuales se había agregado solamente el fosfato y al otro únicamente el hongo), las plantas tuvieron un desarrollo apreciablemente menor (Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung, 1998). Estas pruebas de laboratorio demostraron que podría emplearse el *Aspergillus Níger* como fertilizante biológico en huertas y plantaciones de tamaño

Discusión

relativamente reducido. Además, actualmente se investiga si el hongo puede solubilizar también compuestos de hierro, otro importante micronutriente vegetal.

8.4.1.1. Aplicaciones industriales.

Produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido. Se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de éste en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el medio líquido. En algunas industrias del mundo se alimenta el hongo con melazas o mieles de la industria del azúcar de caña y azúcar de remolacha. También se han estudiado otras alternativas como el almidón.

Se usa en la producción de ácido glucónico, en la fermentación del té (té chino llamado Pu-erh) y en los conservadores de comida.

8.4.1.2. Uso en alimentos.

La producción industrial principal del *Aspergillus niger* está enfocada a la conservación de alimentos (Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton, 2004). Debido a que es un agente de fermentación, puede someterse a un proceso químico que lo hace un polvo que se usa en la conservación de alimentos. Al igual que el jugo de limón o de lima pueden evitar que una manzana o un aguacate se oscurezcan en presencia del oxígeno, el *Aspergillus niger*, que se encuentra en el jugo cítrico, puede ayudar a preservar la comida embotellada y enlatada.

8.4.1.3. *Aspergillus Níger* y salud.

Discusión

Hasta antes del hallazgo de los investigadores de la UNLP, a los *Aspergillus* se los consideraba peligrosos. Esto se debe a que se trata de un hongo ampliamente difundido en la naturaleza, que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón y lana y en plumas, siendo su medio ideal los ambientes oscuros, húmedos y cerrados (Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage, 1997).

Estudios recientes demostraron que las esporas de *Aspergillus* mantienen intacta su capacidad invasiva, e incluso parece aumentar su potencial alergénico después de miles de años (Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser, 1991). Se encontraron esporas en la comida, en la ropa, en las flores y en viejas tumbas: en los restos del rey Casimiro de Polonia y en la momia y el sarcófago de Ramsés II.

La propagación rápida del *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de alergia.

Sin embargo, al ser un hongo *Aspergillus Niger* no causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en horticultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Para tratar esta enfermedad existen ciertos tratamientos entre los que destacan la limpieza y desbridamiento del oído, el tratamiento antimicótico (gotas), la transposición de cerumen en casos resistentes y antiinflamatorios no esteroideos (los esteroides deben utilizarse con mucha

Discusión

cautela, pues pueden ocasionar empeoramiento por inmunosupresión localizada).

8.5. SÍNTESIS DE LA MELANINA EN HONGOS

Las melaninas han sido consideradas como el escudo de los hongos por su capacidad de proteger el microorganismo contra un amplio rango de agresiones tóxicas, tanto de tipo ambiental como producto de la respuesta inmune del huésped durante la infección (Jacobson ES., 2000). Por tal motivo se ha considerado que las melaninas tienen un papel importante en la virulencia de muchos microorganismos.

La mayoría de los hongos contienen melanina y la producción de este pigmento puede proteger el organismo de diversas agresiones ambientales (Jacobson ES., 2000). La importancia de la melanina en los hongos como un producto metabólico es señalada por el hecho de que los hongos melánicos ofrecen una gran cantidad de este producto. Por ejemplo, la melanina aporta, aproximadamente, el 30% del peso seco de las esporas de *Agaricus bisporus*; si este componente representa una parte considerable del hongo, así como las fuentes de energía que debe haber usado para sintetizarla, podría suponerse que las melaninas en los hongos tienen una función predominante.

La mayoría de hongos patógenos para humanos son organismos ambientales y pueden incluir hongos melánicos que actualmente incrementan su importancia clínica (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002).

8.5.1. Melanina en mamíferos

La melanina está presente en todos los animales y varía en sus colores desde el amarillo hasta el negro. En contraste con los microorganismos, en los animales la melanina está localizada en vacuolas especializadas denominadas melanosomas (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). En los mamíferos y las aves está localizada o emigra a

Discusión

los pelos y a las plumas, y en los anfibios y reptiles se localiza en los melanóforos de las células de la piel en la parte superior de la dermis. Sin embargo, hay algunos pigmentos que los animales no pueden sintetizar y los toman directamente de su alimentación de plantas, como son los carotenoides y las xantinas, los cuales son acumulados en los lipóforos. Gracias a todos estos pigmentos los animales pueden camuflarse, mimetizarse, usarlos para las manifestaciones sexuales y apareamiento. También ocurren cambios de color con la edad; en general, cuando los animales son más viejos presentan colores más oscuros o, incluso, llegan a perder el color, como es el caso del encanecimiento en los humanos.

En humanos, la melanina se encuentra en la piel, el cabello, el recubrimiento de la retina, la médula y la zona reticular de la suprarrenal, el oído interno, la “substantia nigra” y la mancha azul del cerebro o locus ceruleus; esta última se denomina neuromelanina, y también se ha encontrado en primates y carnívoros, como los gatos y perros. La neuromelanina se produce químicamente por oxidación de las catecolaminas dopamina y norepinefrina. Los cambios en el metabolismo o la acumulación de la melanina pueden llevar al origen de enfermedades, como en el caso de la pérdida de color en el núcleo del cerebro que se observa en ciertas enfermedades neurodegenerativas, como en el mal de Parkinson, en el cual existe una disminución de neuromelanina en la substantianigra, como consecuencia de una disminución específica de neuronas dopaminérgicas.

Así mismo, la melanina de muchos animales se usa de diversas formas; tal es el caso de la tinta de *Sepia officinalis*, de tono rojizo-marrón que, una vez preparada, es usada por dibujantes y pintores artísticos, aunque su uso se reduce a artistas especializados. El ámbar gris es extraído de sepias, pulpos y calamares, y su principal uso comercial ha sido la elaboración de perfumes, aunque también se ha usado como

Discusión

saborizante y en medicina homeopática (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). No obstante, la melanina ha mostrado tener actividad antiviral in vitro, contra el virus de la inmunodeficiencia humana, y puede inhibir la formación de sincitios o efectos citopáticos producidos por los virus. También se conoce que los insectos generan una respuesta inmune contra la melanina generada por los microorganismos invasores

8.5.2. Importancia de las melaninas en la naturaleza.

La melanización es un proceso encontrado en casi todos los dominios de la naturaleza (arquea, bacteria y eucaria), aunque los reportes hasta el presente se han centrado en los dominios bacteria y eucaria; en este último es donde encontramos los hongos, los animales y las plantas (Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage, 1997).

En las plantas la melanina es de tipo DNH-melanina y hace parte de los metabolitos secundarios; una gran variedad de funciones se han asociado con la melanina; puede servir como transmisora de energía, unir medicamentos y químicos, y afectar la integridad celular. Las melaninas también son usadas como camuflaje y para manifestaciones sexuales (Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage, 1997). La tinta de *Sepia officinalis* es una suspensión de partículas de melanina que ha mostrado tener actividad antiviral in vitro contra el virus de la inmunodeficiencia humana y puede inhibir la formación de sincitios o efectos citopáticos producidos por los virus. Los insectos generan una respuesta inmune contra la melanina expresada por los microorganismos invasores. En general, la melanina ha sido involucrada en muchos procesos fisiológicos, fisiopatológicos y patogénicos. En la actualidad se ha reportado la producción de melanina por muchos microorganismos, tanto ambientales como patógenos, para plantas y animales.

Discusión

En los mamíferos, la melanina es producida por los melanocitos y se localiza en vacuolas especializadas denominadas melanosomas; los melanocitos producen principalmente DOPA-melaninas (eumelanina y feomelanina). La coloración del cabello y la melanina en la piel brindan protección contra la luz solar y en cierto grado de resistencia a melanomas en radiaciones terapéuticas; sin embargo, el papel de la melanina sigue siendo desconocido en otros casos, por ejemplo, en la sustancia nigra del cerebro humano

Los hongos radiotróficos son aquellos que aparentemente hacen uso del pigmento melanina para convertir la radiación gamma 1 en energía química que utilizan para su crecimiento (Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage,1997).Este mecanismo propuesto podría ser similar al de fijación del carbono en los organismos fotótrofos, los cuales capturan fotones de la luz visible por medio de pigmentos como la clorofila, para luego utilizar su energía en la generación de ATP y poder reductor desembocando finalmente en la fotólisis del agua. Sin embargo, aún se desconoce si los hongos que contienen melanina emplean una ruta metabólica de múltiples pasos similar a la de la fotosíntesis, o algún tipo de ruta de quimiosíntesis.

8.5.3. Comparación con los hongos no melanizados

La melanización, por otro lado, tiene un coste metabólico elevado para las células fúngicas. En ausencia de radiación, algunos hongos sin melanina (que habían sufrido mutaciones en la vía de biosíntesis de melanina) crecieron a mucha más velocidad que sus equivalentes melanizados (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002).Se ha sugerido que la presencia de moléculas de melanina en la pared celular de los hongos podría limitar la incorporación de nutrientes, o que se podrían formar compuestos intermediarios tóxicos para la célula durante la síntesis de melanina, lo que contribuiría a la observación de este fenómeno. Esto es consistente con la observación de que a pesar

Discusión

de que muchos hongos son capaces de producir melanina, no lo hacen constitutivamente (es decir durante todo el tiempo), sino que lo hacen en respuesta a un estímulo externo durante diferentes etapas de su desarrollo.

El proceso bioquímico exacto por el cual se produciría la síntesis de compuestos orgánicos mediada por la melanina, como se ha sugerido para el crecimiento de estos hongos, incluyendo los intermediarios químicos (tales como moléculas dadoras electrónicas y aceptoras electrónicas nativas) y productos químicos, aún es desconocido (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002).

Un estudio sugiere que algunos hongos pueden usar la radiación ionizante como fuente de energía y además explica por qué algunas especies de hongos sobreviven en ambientes extremos.

Hay más especies de hongos que de plantas o animales. Los científicos han asumido desde siempre que los hongos sólo se dedican a descomponer la materia orgánica para obtener nutrientes y energía ocupando un escalón ecológico por encima de las plantas, que son las productoras primarias de energía. Esta visión se ha visto trastocada recientemente a raíz de un trabajo publicado en PLoS y del cual se han hecho eco en muchos medios.

En la década de los noventa el microbiólogo Nelli Zhdanova del Instituto de Microbiología y Virología de Kiev publicó una serie de informes dramáticos sobre el crecimiento de hongos en las paredes de la accidentada central nuclear de la Chernobyl y en el terreno circundante.

Los expertos lograron identificar alrededor de 200 especies en la zona. Muchas de ellas contenían un familiar pigmento que absorbe la radiación ionizante: melanina.

La melanina es el pigmento que producimos los humanos en la piel para protegernos de los rayos ultravioleta del Sol y que nos da el tono bronceado. La

Discusión

melanina es un buen absorbente de la radiación, una vez la absorbe disipa su energía rápidamente en forma de calor. Gracias a esto somos menos susceptibles de padecer cáncer de piel.

Los trabajos de Zhdanova inspiraron a unos investigadores del Albert Einstein College of Medicine en New York City liderados por Ekaterina Dadachova y Arturo Casadevall. Forzaron artificialmente al *Cryptococcus neoformans*, un hongo patógeno tipo levadura, a producir levadura y lo expusieron a la radiación. Pudieron observar que la melanina forma parte de las reacciones metabólicas (Hamilton AJ, BL Gómez, 2002). La radiación transfiere parte de su energía a los electrones de la melanina permitiendo a este pigmento producir reacciones metabólicas de oxidación.

Cuando las colonias de células de *Cryptococcus neoformans* fueron expuestas a una intensidad de radiación 500 veces mayor del nivel normal de fondo conseguían crecer tres veces más deprisa. La radiación utilizada era de tipo beta (electrones a gran velocidad), y procedía del radioisótopo cesio.

Ya hemos dicho que la melanina es un pigmento que se halla en la mayor parte de los seres vivos. En los animales el pigmento se deriva del aminoácido tirosina. La forma más común de melanina es la eumelanina, un polímero negro-marrón de ácidos carboxílicos de dihidroxindol y sus formas reducidas.

En los humanos la melanina se encuentra en la piel, el pelo, en el epitelio pigmentado que rodea la retina, la médula espinal y la zona reticular de la glándula suprarrenal; en la estría vascularis del oído interno y en ciertas zonas profundas del núcleo del cerebro, como el locus coeruleus y la substantia nigra (Jacobson ES., 2000). La melanina es determinante en el color de la piel humana; en efecto si una persona se broncea por causa del sol, ese bronceado se va a producir de forma temporal pues con el tiempo la célula pierde la capa que le rodea (melanina

Discusión

bronceada) y la persona vuelve a obtener la feomelanina perdida que ha sido cambiada por la eumelanina bronceada y a recuperar su piel normal (Jacobson ES., 2000).

8.5.4. Tipos de melaninas.

Ya que la melanina está compuesta de moléculas pequeñas, existen muchos tipos de melaninas. Tanto la feomelanina como la eumelanina sí se pueden encontrar en la piel y cabello humanos, pero la eumelanina es la más abundante de las melaninas en los humanos. También es la que más frecuentemente muestra deficiencias en el albinismo, aunque también hay albinismos por falta de feomelanina e incluso a veces de ambas melaninas.

Se piensa que la eumelanina es el principal agente protector para numerosas formas de vida en contra de la radiación ultravioleta, pero recientes estudios sugieren que este polímero podría tener distintas funciones para cada organismo (Jacobson ES., 2000). Por ejemplo, la inmunidad innata de los invertebrados frente a los patógenos invasores es influida principalmente por la melanina: a solo minutos de la infección, el microbio es encapsulado en melanina (mecanización); los radicales libres generados después de la formación de esta cápsula ayudan a su eliminación.

En la melanina es común encontrar en los polímeros numerosos enlaces cruzados: 5,6-dihidroxyndol (DHI) y 5,6-dihidroxyndol-2 ácido carboxílico (DHICA); esto ha sido descubierto en recientes investigaciones dentro de las propiedades eléctricas de la eumelanina. Sin embargo, esto ha indicado que tal vez existe otro mecanismo conformado por oligómeros básicos que se adhieren unos a otros.

La estructura molecular de la melanina se encuentra constantemente en estudio.

La eumelanina se encuentra en la piel, iris y el cabello y su concentración da la coloración al cabello gris, negro, amarillo, y castaño (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G

Discusión

Gadd, 2007). En los humanos es abundante en la gente con piel oscura. Existen dos tipos de eumelanina que se distinguen el uno del otro por diferentes enlaces químicos. Estos son la eumelanina marrón y la eumelanina negra.

Los tricocromos (denominados anteriormente tricosiderinas) son pigmentos producidos por la misma ruta metabólica que las eumelaninas y feomelanina pero a diferencia de estos últimos tienen bajo peso molecular. Se los encuentra en algunas formas de cabello.

La neuromelanina es el pigmento oscuro presente en las neuronas que recubren cuatro núcleos del cerebro: la pars compacta de la sustancia nigra (en latín «sustancia negra»), la parte del locus coeruleus (o «punto azul»), el núcleo dorsal motor del nervio vago (nervio craneal X) y la parte media del núcleo del puente de Varolio. Ambos, la sustancia nigra y el locus coeruleus, pueden ser fácilmente identificados en el momento de una autopsia debido a su pigmentación oscura; en los humanos este núcleo no se encuentra pigmentado al momento de su nacimiento, el pigmento aparece después de la madurez. Aunque la función de la neuromelanina en el cerebro sigue siendo desconocida, puede que sea el resultado de las monoaminas contenidas en los neurotransmisores, cuya única fuente se encuentra en las neuronas. La pérdida de color en el núcleo del cerebro es observada en ciertas enfermedades neurodegenerativas.

Los melanocitos se encargan de insertar gránulos de melanina en vesículas celulares especializadas, llamadas melanosomas (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Después, éstos son transportados al interior de otras células de la piel localizadas en la epidermis. Los melanosomas se acumulan sobre el núcleo de la célula, donde protegen el ADN nuclear de cualquier mutación causada por la ionización o radiación que provocan los rayos ultravioleta del Sol. La gente donde sus ancestros

Discusión

vivieron por largos periodos en regiones cercanas al ecuador generalmente tiene cantidades mayores de eumelanina en su piel. Esto hace que su piel se vea café o bien negra, y los protege de largos periodos de exposición solar, lo que frecuentemente resulta en melanomas en gente con tonos de piel más claros.

Eumelanina, sol y vitamina D.

En los humanos, la exposición directa a la luz solar produce vitamina D3 en la piel al reaccionar el 7-deshidrocolesterol con la luz ultravioleta (UVB) en longitudes de onda entre 270 y 300 nm. Dado que los altos niveles de melanina cutánea actúan como un protector solar natural, la piel oscura puede tener riesgos de deficiencia de vitamina D. La vitamina D es necesaria para prevenir el raquitismo, una enfermedad causada por falta de calcio. Es encontrada en cantidad en el aceite de pescado.

Afortunadamente, en 1930 la vitamina D fue descubierta y así se pudo dispensar como un suplemento a su dieta. En estos días alimentos como la leche o el pan están fortificados con vitamina D.

Estudios recientes demuestran que toda la humanidad se originó en África. Es más probable que los primeros pobladores hayan contado con grandes cantidades de melanocitos productores de eumelanina. Acorde a esto, tenían la piel oscura (como la muestra la gente originaria de África). Cuando alguna de esta gente migró y se estableció en otras zonas de Asia y Europa, la presión selectiva para la producción de eumelanina disminuyó en climas donde la radiación del sol era menos intensa; estas variaciones en los genes hicieron que la producción de melanina disminuyera en la población, resultando en cabello y piel más claros, sobre todo en las latitudes más altas. De las dos variantes genéticas comunes conocidas por estar asociadas con la piel humana pálida, Mc1r no parece que haya sido objeto de selección positiva (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007).

Discusión

Del mismo modo que la gente que migró hacia el norte, los que tienen piel clara y migraron al sur se aclimataron a una radiación solar más fuerte. La piel de la mayoría de la gente se oscurece al ser expuesta a luz UV, dándoles así mayor protección cuando es necesario. Este es el sentido fisiológico del bronceado (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). La gente con la piel oscurecida, que ha producido más eumelanina, tienen mayor protección contra las quemaduras solares y el desarrollo de melanoma, que es una forma potencialmente mortal de cáncer de piel, así como otros problemas de salud relacionados, incluyendo la fotodegradación de ciertas vitaminas como las riboflavinas, carotenoides, tocoferol, y folato.

La melanina ayuda a proteger los ojos de la luz ultravioleta, así como de la luz visible de alta frecuencia; por ello la gente de ojos azules se encuentra en mayor riesgo de padecer problemas en los ojos relacionados con la radiación solar (Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd, 2007). Además, las lentes oculares se amarillean con la edad, agregando más protección; sin embargo, estas mismas se vuelven más rígidas y pierden su orden, afectando a la capacidad de cambiar de forma para enfocar de lejos a cerca, un daño probablemente debido a la agregación de vitaminas, causada por la exposición a los rayos UVA.

Un reciente descubrimiento hecho por J.D. Simon sugiere que la melanina podría tener un papel relevante dentro de la fotoprotección. La melanina es capaz de ligar efectivamente los iones de metal a través de sus grupos de carboxilato e hidroxifenólicos, y en muchos casos mucho más eficientemente que la poderosa EDTA. Y así podría servir para neutralizar iones de metal potencialmente tóxicos, protegiendo al resto de la célula. Esta hipótesis mantiene el hecho de que la pérdida de neuromelanina en la enfermedad de Parkinson está ligada a un incremento en los niveles de hierro en el cerebro.

Discusión

La melanina es un biopolímero y un neuropéptido. Las melaninas son estructuras rígidas de polímeros conductores compuestos de poliacetileno, polipirrol, y polianilina «negros» y sus polímeros mezclados. La melanina más simple es el poliacetileno, del cual derivan todos los demás, algunas melaninas fungales son poliacetileno puro.

Estos descubrimientos estuvieron perdidos hasta el resurgimiento reciente de melaninas usadas en dispositivos, particularmente en displays electroluminiscentes. En el año 2000, el premio Nobel de química fue obtenido por tres científicos por el subsecuente (re)descubrimiento y el desarrollo de dichos polímeros conductores orgánicos. Al parecer el Comité del premio Nobel no tenía ninguna evidencia del reporte casi idéntico que Weiss registró en 1977 sobre la alta conductividad pasiva en el polipirrol, ni de las propiedades de alta conductividad de la melanina DOPA y sus semiconductores similares. El dispositivo electrónico orgánico de melanina es exhibido en estos días en el Museo Nacional de la Historia Americana de la Institución Smithsonian, en su sala Smithsonian Chips que cuenta con una colección de dispositivos electrónicos históricos.

La melanina influencia la actividad neuronal y media la conducción de radiación, luz, calor y energía cinética. Así pues, es sujeto de constante interés en la investigación y desarrollo biotecnológico, más notablemente en los electrónicos orgánicos (algunas veces llamados «electrónicos plásticos») y nanotecnología, donde semiconductores son usados para incrementar la conductividad de la melanina (Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton, 2004). El pirrol y acetileno negros son los semiconductores orgánicos estudiados más frecuentemente.

Las fiálides, para poder realizar todos los mecanismos de maduración, tienen una disposición especial, de ahí que presenten una disposición a modo de mosaico, en

Discusión

la fase de síntesis de las granulaciones, y en hileras cuando están en fase de transición a los conidios.

Los conidios junto a las fiálides son los componentes más numerosos de los conidióforos (Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton, 2004). Sus componentes citoplasmáticos confirman que se tratan de células de maduración para la formación de las esporas, por eso para facilitar la expulsión de las esporas de los conidióforos, los conidios se disponen en hileras de diversa longitud, en las que se aprecia una maduración tanto de núcleo como de citoplasma.

Las células correspondientes a las vesículas, que se inician en el cono, se disponen de forma radial y tiene forma alargada, inician la disposición radial del resto de componentes (Herrera, MM, Molina, A, Blanco, A., 2017). Estas células tienen una pared rígida y su componente celular es alargado y está rodeado de espacios claros. La existencia de escasas mitosis, con escasos cromosomas, indica que su división mitótica para producir las métulas es muy rápida.

Los estudios realizados al MET de las métulas indican que estos componentes son de transición y carecen de relevancia funcional como indican sus escasos organoides citoplasmáticos y su presencia sea corta como indican las mitosis que darán paso a la formación de las fiálides(Herrera, MM, Molina, A, Blanco, A., 2017).

Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforo, las células eucariotas que tiene mayor actividad funcional son las fiálides. Por una parte el gran número de mitosis que hemos observado indica un aumento en el número de células que posteriormente se transformaran en los conidios, y que no solo actúa como una zona germinal, sino que por lo contrario sus numerosos componentes citoplasmáticos facilitaran la formación de los conidios e incluso darle la coloración negra a las colonias (Herrera, MM, Molina, A, Blanco, A., 2017). Dentro de las granulaciones existentes se

Discusión

desprende dos funciones importantes, en primer lugar los gránulos proteicos claros que tienen una clara función de producir las envueltas de los conidios y posteriormente las esporas, y esta formación de los gránulos proteicos participa fundamentalmente su retículo rugoso. Y en segundo lugar los gránulos muy densos corresponden a melanina.

De las descripciones que hemos realizado, tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión, se deduce que la coloración negra de las colonias se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las fiálides pigmentadas. Hemos podido comprobar que en aquellos conidióforos cuyas fiálides contienen más pigmento se traduce en una mayor coloración de las colonias (Herrera, MM, Molina, A, Blanco, A., 2017). En las colonias jóvenes en las que su coloración es homogénea y apenas oscura, indica que la melanina es escasa y está distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo, macroscópicamente el aumento del color negro y su disposición central en la colonia parece indicar que los conidióforos tienen un mayor número de fiálides pigmentadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias.

Los cuerpos micóticos melánicos son más prevalentes en los hongos aéreos y en los que viven en las rocas. Las melaninas producidas por *Cladosporium* sp. y *Oidiodendron* sp. protegen contra la luz ultravioleta y la radiación gamma e, incluso, contra la irradiación solar artificial y la desecación.

Las conidias mutantes albinas de *Moniliniafructícola* fueron mucho más susceptibles a la luz ultravioleta que las conidias nativas.

Existe una indicación más inquietante de los efectos protectores de las melaninas en los microorganismos contra la radiación en los estudios realizados en los pacientes (obreros expuestos a la radiación) y en los suelos de los alrededores del

Discusión

reactor nuclear de Chernobyl. La microflora del sitio del reactor provee una de las más fuertes asociaciones entre la melanogénesis de los hongos y su capacidad para sobrevivir en ambientes extremos, así como la producción de infección en humanos por cepas de microorganismos que generaron melanina, hongos filamentosos (como *Alternaria alternata* reactor strains) parecen estar genéticamente adaptados a altas dosis de radiación y una de las características de estas cepas es la producción de melanina. En los lavados broncoalveolares y esputos de pacientes (obreros expuestos a la radiación) con patología crónica pulmonar, se encontraron muestras con hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp. y *Cándida albicans*) y melaninas extraídas de sus conidias. Estos autores proponen una hipótesis: "el polvo radiactivo y los micromicetos mutantes fueron inhalados por las personas durante su trabajo en el reactor; por lo tanto, esto generó una pérdida de la respuesta inmune en las personas y una infección por hongos mutantes resistentes". Finalmente, y de hecho, las melaninas han sido usadas comercialmente en cremas de protección solar, o sus enzimas e intermediarios para incrementar la producción de melanina.

8.6. MOHOS PERJUDICIALES

Estos aparecen en forma de manchas verdes. Muchos están provocados por *Penicillium digitatum* que, en la cáscara de los cítricos, aparecen con sus características esporas verdeazuladas. Se desarrolla sobre todo a temperaturas de unos 20 °C y humedad alta, y suele introducirse en la fruta a través de heridas (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). Este tipo de mohos son grandes expertos de la reproducción. En el caso del que afecta al pan, *Rhizopus stolonifer*, este se percibe porque aparecen puntitos negros que se llaman esporangios, es decir, cápsulas con esporas. A medida que los mohos crecen, se forman esporas, pequeñas partículas visibles que le confieren el color verdoso, blanco o grisáceo al

Discusión

alimento. Esto es sinónimo de que los mohos han penetrado muy en el interior del alimento. Estos alimentos no son aptos para el consumo.

Para minimizar el crecimiento de este tipo de hongos en los alimentos, la limpieza es fundamental. Las esporas pueden acumularse en la heladera, los trapos de cocina y otros utensilios de cocina, por tanto, es muy importante mantenerlos limpios y secos. Las micotoxinas suelen crecer en ambientes con temperaturas templadas (entre los 24 y 28 °C) y con una tasa de humedad elevada (Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck, 2002). En el ámbito doméstico, la prevención pasa por establecer condiciones de almacenamiento óptimas: buena ventilación, temperatura y humedad, y seguir unas correctas condiciones de higiene durante la preparación de alimentos. Otro consejo es comprar solo lo necesario para consumir, según datos de la OMS estamos tirando 1/3 de la comida que comemos. Si compramos lo justo, no se arruina la comida, y evitamos riesgos innecesarios, tirar el dinero y desperdiciar alimentos.

La degradación de las obras de arte no es más que un aspecto de la continua transformación que la materia, orgánica o inorgánica, sufre en la naturaleza. Estas transformaciones tienen como fin el evitar que los constituyentes químicos fundamentales se encuentren inmovilizados en estructuras más o menos complejas y sean así sustraídos al ciclo continuo de los elementos.

Los organismos que intervienen en estos ciclos comprenden desde bacterias, hongos y líquenes hasta otras formas de vida más complejas, como los insectos e incluso el hombre. Este ocupa un puesto muy importante, en muchos casos determinantes, alterando el equilibrio de la naturaleza y produciendo, por ejemplo, ingentes cantidades de residuos no degradables, que escapan al ciclo de los elementos. Las causas de alteración de las pinturas murales son múltiples, combinándose a menudo y creando una de ellas las condiciones favorables para el establecimiento de las otras.

Discusión

De todas, la más importante por su frecuencia y por la variedad de causas secundarias que desencadena, es la humedad. Sin ella, por ejemplo, no se originarían ciertos procesos químicos de alteración ni se producirían los ataques biológicos cuya actividad, en ciertos casos, conduce a una destrucción de los frescos. En el caso que nos ocupa se ha observado una excesiva humedad en los muros que soportan los frescos del pintor Vázquez Díaz, en el monasterio de Santa María de la Rábida (Huelva), lo que ha originado la aparición de eflorescencias salinas y la proliferación de una flora microbiana que ha invadido los murales y deteriorado la original policromía del conjunto. Como parte de un proyecto destinado a la restauración de la sala Vázquez Díaz se ha llevado a cabo un estudio microbiológico de los frescos para conocer la naturaleza de la invasión microbiana y posibilitar una acción eficaz frente a los complejos fenómenos físico-químicos y biológicos que han originado la degradación de tales pinturas. Aunque la microflora existente en los frescos es una mezcla compleja de diversos tipos de microorganismos (bacterias autótrofas, bacterias heterótrofas, actinomicetos y hongos), en este trabajo se presentan resultados preliminares obtenidos en el estudio de la microflora fúngica.

9.- Conclusiones

9. Conclusiones

1ª. La identificación y descripción de estos hongos microscópicos los hemos realizado en lienzos de cuadros y maderas de esculturas, y se destaca que son similares tanto en su viabilidad como en su constitución.

2ª. La viabilidad de estos hongos en las telas de los cuadros alterados, que se caracterizan por estar más afectados por la humedad, y que preferentemente predominan son el *aspergillus niger* y los *penincillium candidum*.

3ª. Tanto el microscópico óptico como el microscopio electrónico de barrido como el de transmisión nos han permitido no solo su identificación sino el conocimiento de los componentes celulares de los hongos microscópicos contaminantes

4ª. Los estudios realizados al microscopio electrónico de transmisión de las mótulas, indican que estos componentes son de transición, y su papel funcional es participar en la formación de la pared de las esporas, tanto en los *aspergillus niger* así como en los *penincillium candidum*.

Conclusiones

5ª. Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforos de los *aspergillus niger*, las células eucariotas que tienen mayor actividad funcional son las fiálides, responsables de la síntesis y almacenamiento de la melanina.

6ª. En las imágenes que hemos obtenido de la septación en las hifas hemos podido comprobar al TEM que éstas corresponden a las fases de citocinesis de la división mitótica que pueden mantener puntos de unión.

7ª. De las descripciones que hemos realizado, tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión, se deduce que la coloración negra de las colonias de los *aspergillus niger* se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las fiálides pigmentadas.

8ª. En las colonias de los *aspergillus niger* jóvenes cuando su coloración es escasa nos está indicando que la melanina está en poca cantidad y distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo, macroscópicamente, el aumento del color negro y su disposición central en la colonia parece indicar que los conidióforos tienen un mayor número de fiálides pigmentadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias.

10.- Resumen

10. Resumen

En este trabajo hemos descrito con el microscopio óptico (MO) y microscopio electrónico de barrido (MEB) y transmisión (MET), los diferentes componentes: vesículas, métulas, fiálides, conidios y esporas del *Penicillium candidum* y *Aspergillus niger*. Los hongos proceden de telas de cuadros, que se han visto afectados por su contaminación.

Como objetivos del trabajo nos planteamos en primer lugar conocer la viabilidad de estos hongos contaminantes. Conocer la morfología a través de los estudios al MO y MEB y finalmente conocer la evolución mediante el análisis morfológico con el MET. Por otro lado existen numerosas descripciones al MO y MEB de los componentes celulares de *Aspergillus* y *Penicillium*. En cambio son escasos e incompletos los estudios descriptivos que existen en la bibliografía consultada, con la utilización del MET, de las células eucariotas de estos hongos, por lo que se puede considerar una importante aportación para su conocimiento y funcionamiento, sobre todo de las métulas y fiálides.

Es importante conocer las granulaciones que se presentan en las métulas y fiálides, que participan activamente en la defensa de estos hongos. Son granulaciones específicas y similares en ambos hongos, Y hay que señalar las granulaciones proteicas y de mediana densidad

Resumen

electrónica que presentan estas células y que definitivamente son las responsables de la producción de las envueltas de las esporas. En cambio existe una diferencia importante en las granulaciones de *Aspergillus niger* en comparación con *Penicillium*. En *Aspergillus* se producen granulaciones muy densas a los electrones y que se identifican con melanina, protegiendo selectivamente a este hongo.

11.- Abstract

11. Abstract

In this manuscript, we have described the different components, vesicles, metulae, phialides, conidia and spores of *Penicillium candidum* and *Aspergillus niger* with the scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The fungi come from plaid fabrics, which have been affected by their contamination.

As objectives of the work, firstly to know the viability of these contaminating fungi. To know the morphology through the studies with MO and SEM and finally to know the evolution through the morphological analysis with TEM. On the other hand there are numerous descriptions to MO and SEM of the cellular components of *Aspergillus* and *Penicillium*. In contrast, the descriptive studies that exist in the literature consulted, with the use of TEM, of the eukaryotic cells of these fungi are scarce and incomplete, so that it can be considered an important contribution for their knowledge and functioning, especially of the metulae and phialides.

One of the most important facts is to know the granulations that occur in the metulae and phialides, which participate actively in the defense of these fungi. As specific and similar granulations in both fungi, it is necessary to point out the proteinic and medium electron density granulations that these cells present and that are definitely responsible for the production of the

Abstract

spore shells. In contrast, there is a significant difference in the granulations of the *Aspergillusniger* compared to the *Penicillium*; *Aspergillus* produces very dense granulations to the electrons and that are identified with melanin, which selectively protect this fungus.

12.- Bibliografía

12. Bibliografía

Bibliografía usada en el trabajo publicado

Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd. (2007). "Effect of nutrient availability on hyphal maturation and topographical sensing in *Aspergillus niger*". *Mycoscience* 48: 145-151.

Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser. (1991). "The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate". *Current Genetics* 19: 21-26.

Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes. (1999) "New PCR Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton .(2004). "Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*". *J Med Microbiol.* 53: 175-181. 10.1099/jmm.0.05421-0.method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate". *FEMS Microbiology Letters* 180: 191-196

Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung. (1998). "The developmentally regulated ALB1 gene of *Aspergillus fumigatus* : its role in modulation of conidial morphology and virulence". *Journal of Bacteriology* 180: 3031-3038.

Bibliografia

Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage.(1997). "Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence". *Infect Immun.* 65: 5110-5117.

Jacobson ES. (2000) "Pathogenic roles for fungal melanins". *Clin Microbiol Rev.* 13: 708-717. 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.

Hamilton AJ, BL Gomez. (2002). "Melanins in fungal pathogens". *J Med Microbio* 151: 189-191.

Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. (1985). "Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium* Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematic". New York Plenum Press: 71-82.

Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd. (2007). "Effect of nutrient availability on hyphal maturation and topographical sensing in *Aspergillus niger*". *Mycoscience* 48: 145-151.

Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser. (1991). "The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate". *Current Genetics* 19: 21-26.

Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes. (1999) "New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate". *FEMS Microbiology Letters* 180: 191-196

Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung. (1998). "The developmentally regulated ALB1 gene of *Aspergillus fumigatus* : its role in modulation of conidial morphology and virulence". *Journal of Bacteriology* 180: 3031-3038.

Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton .(2004). "Production of melanin by *Aspergillus fumigates*". *J Med Microbiol.* 53: 175-181. 10.1099/jmm.0.05421-0.

Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage.(1997). "Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence". *Infect Immun.* 65: 5110-5117.

Bibliografía

Jacobson ES. (2000) "Pathogenic roles for fungal melanins". Clin Microbiol Rev. 13: 708-717. 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.

Hamilton AJ, BL Gomez. (2002). "Melanins in fungal pathogens". J Med Microbiol 51: 189-191.

Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. (1985). "Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium* En: Samson RA y JI Pitt (Eds.) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematic". New York Plenum Press: 71-82.

Van de Vondervoort P, B Poulsen, G Ruijter, T Schuleit, J Visser, JIversen. (2004). "Isolation of a fluffy mutant of *Aspergillus niger* from chemostat culture and its potential use as a morphological stable host for protein production". Biotechnology and Bioengineering 86: 301-307.

Loudon KW, APCoke, JP Burnie, AJShaw, BA Oppenheim, CQ Morris. (1996) "Kitchens as a source of *Aspergillus niger* infection". Journal of Hospital Infection 32: 191–198.

Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijck. (2002). "On the safety of *Aspergillus niger* – a review". Applied Microbiology and Biotechnology 59: 426-435.

Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd. (2014) "Regulation of vectorial supply of vesicles to the hyphal tip determines thigmotropism in *Neurospora crassa*". Fungal Biology 118(3): 287-294.

Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal. (2015). "Identification of *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. niger*) Allergens and Heterogeneity of Allergic Patients' IgE Response". Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, 14(4), 361.

Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS Meor Hussin. (2016). "Response Surface Methodology Modelling of an Aqueous Two-Phase System for Purification of Protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under Solid State Fermentation and Its Biochemical Characterization". International journal of molecular sciences, 17(11), 1872.

Bibliografía

Bibliografía general.

Aarts, H. y Keijer, J. (1999). Genomic fingerprinting of micro-organisms by automatic laser fluorescence analysis (ALFA) of amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3: 9- 10.

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2650-2652.

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64 (6): 903-906.

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66 (3): 504-506.

Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. y Cabañes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86: 33-49.

Abbas, H.K. (Ed.) (2005). *Aflatoxin and Food Safety*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. Pág. 585.

Abrunhosa, L., Serra, R. y Venâncio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25): 7493-6.

Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L. y Cabañes, F.J. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 191-196.

Bibliografía

Accensi, F., Abarca, M.L., Cano, J., Figuera, L. y Cabañes, F.J. (2001). Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79 (3-4): 365-370.

Accensi, F., Abarca, M.L. y Cabañes, F.J. (2004). Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. *Food Microbiology*, 21: 623-627.

Al-Musallam, A.A. (1980). *Aspergillus helicothrix*, sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46 (4): 407-411.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.

Andersen, C.B., Holst-Jensen, A., Berdal, K.G., Thorstensen, T. y Tengs, T. (2006). Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26): 9658-9663.

Araguas, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A. y Bello., J. (2003). Acerca de la posible contaminación por ocratoxina en alimentos. I. Cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la Comunidad Foral de Navarra. *Alimentaria*: 23-29.

Arnheim, N., Krystal, M., Schmickel, R., Wilson, G., Ryder, O. y Zimmer, E. (1980). Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77: 7323-7327.

Arroyo, M., Aldred, D., y Magan, N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by

Bibliografía

Penicillium verrucosum isolates in bread. International Journal of Food Microbiology, 98 (3): 223-231.

Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E.L. y Wogan, G.N. (1963). Aflatoxins B and G. Journal of the American Chemical Society, 85: 1705-1707.

Assaf, H., Azouri, H. y Pallardy, M. (2004). Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-xL. Toxicological Sciences, 79 (2): 335-44.

Atoui, A., Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi A. (2006). Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in Aspergillus ochraceus and Aspergillus carbonarius producers of ochratoxin A. Molecular nutrition & food research, 50 (6): 488-493.

Atoui, A., Mathieu, F. y Lebrihi, A. (2007a). Targeting a polyketide synthase gene for Aspergillus carbonarius quantification and ochratoxin A assessment in grapes using realtime PCR. International Journal of Food Microbiology, 115: 313–318.

Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F., Magan, N. y Lebrihi, A. (2007b). Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of Aspergillus carbonarius and the impact on toxin contamination of grapes and wine. Journal of Applied Microbiology, 103 (4): 961-968.

Aukema, H.M., House, J.D., Bankovic-Calic, N. y Ogborn, M.R. (2004). Increased renal fibrosis and expression of renal phosphatidylinositol 4-kinase-beta and phospholipase C (gamma1) proteins in piglets exposed to ochratoxin-A. Nephron Physiology, 96 (1): 19- 25.

Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R. y Abate, D. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. Mycopathologia, 162 (1): 57-63.

Baker, S.E. y Bennett, J.W. (2008). The aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. Págs. 3-13.

Bibliografía

Baliukoniene, V., Bakutis, B. y Stankevicius, H. (2003). Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2): 223-227.

Bankole, S.A., Ogunsanwo, B.M. y Mabekoje, O.O. (2004). Natural occurrence of moulds and aflatoxin B1 in melon seeds from markets in Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (8): 1309-1314.

Barnett, H.L. y Hunter, B.A. (1998). *Illustrated genera of imperfecti fungi*. 4ª edición. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, EEUU.

Bartine, H. y Tantaoui-Elaraki, A. (1997). Growth and toxigenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 16: 61-65.

Battilani, P., Giorni, P. y Pietri, A. (2003a). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715-722.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L. Giorni, P. y Kozakiewicz, Z. (2003b). Occurrence of Ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66 (4): 633-636.

Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. y Magan, N. (2006a). Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S72- S82.

Battilani, P., Magan, N. y Logrieco, A. (2006b). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S2-S4.

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S. y Cabañes, F.J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2): 125-30.

Bibliografía

Bayman, P. y Baker, J.L. (2006). Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, 162 (3): 215-223. Beardall, J.M. y Miller, J.D. (1994). Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. En: *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, EEUU. Págs. 487-539.

Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2003). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 72-77.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2004a). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus section Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (1): 19-27.

Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2004b). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 541-546.

Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín S. (2004c). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (1): 72-77.

Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V. y Marín, S. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): 839-44.

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J. y Bragulat, M.R. (2006a). *Mycobiota* and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S40-S45.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2006b). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23 (10): 1021-9.

Bibliografía

Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S. (2006c). Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology*, 23 (7): 622- 627.

Bendele, A.M., Carlton, W.W., Krogh, P. y Lillehoj, E.B. (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J 3 C3H)F1 mouse. *Journal of National Cancer Institute*, 75: 733-742.

Bennett, J.W. y Papa, K.E. (1988). The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Advances in Plant Pathology*, 6: 263-280. Bennet, J.W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16: 497-516.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. y Wheeler, D.L. (2002). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 30: 17-20.

Beretta, B., De Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C. y Restani, P. (2002). Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 19 (1): 70-75.

Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. y Cleveland, T.E. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 83–93.

Bleas, M.J., De Grandis, S.A. y Trevors, J.T. (1998). Amplified fragment length polymorphisms (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21: 99-114.

Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C. y Mañes, J. (2006). Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6): 473-478.

Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A. y Woloshuk, C.P. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for the differential detection of trichotecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65: 1955-1961.

Bibliografía

Bogs, C., Battilani, P. y Geisen, R. (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (1): 39-47.

Boon, P.E., Tjoe Nij, E.I.M., Van Donkersgoed, G. y Van Klaveren, J.D. (2004). Probabilistic intake calculations performed for the Codex Committee on Pesticide Residues. Report 2004-2005. RIKILT - Institute of Food Safety, Wageningen, Holanda.

Botstein D., White R.L., Skolnick M. y Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Annual Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314-331.

Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S. y Morgavi, D.P. (2007). Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90 (7): 3197-3201.

Boudra, H., Le Bars, P. y Le Bars, J. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1156-1158. Bove, F.J. (1970). *The story of ergot*. Basel. Nueva York, EEUU.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L. y Cabañes F.J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139-144.

Bragulat, M.R., Martínez, E., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1-2): 43-48.

Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H. y Leonard, T.J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (4): 1418-1422.

Bibliografía

Bullerman, L.B. y Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.

Burdaspal, P.A. y Legarda, T. M. (1999). Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, 36: 107-113.

Cabañas, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Cabañes FJ. (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiology*, 25(5): 642-647.

Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Mínguez, S. y Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215.

Canela, R., Viladrich, R., Velázquez, C.A. y Sanchis, V. (1994). A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. *Mycopathologia*, 125 (1): 29-32.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. y Gooday, G. (2001). *The Fungi*. Academic Press, Londres, Reino Unido.

Carmichael, J.W., Brycekendrick, W. y Conners, I.L. (1980). *The genera of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canadá.

Cary, J.W., Klich, M.A. y Beltz, S.B. (2005) Characterization of aflatoxin producing fungi outside of *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia*, 97: 425-432.

Cary, J.W. y Ehrlich, K.C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162: 167–177

Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N., Hietanen, E. y Bartsch, H. (1990). Are mycotoxins risk factors for endemic nephropathy and associated urothelial cancers? *Archiv für Geschwulstforschung*, 60 (4): 295-303.

Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.G. y Telling, G.M. (1991). Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory

Bibliografía

wastes: some mycotoxins. International Agency for Research on Cancer Scientific Publications, 113. Lyon, Francia.

Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. y Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50 (6): 519-529.

Castellá, G., Larsen, T.O., Cabañes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P. y Geisen, R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25 (1): 74-83.

Castelo, M.M., Sumner, S.S. y Bullerman, L.B. (1998). Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food Protection*, 61 (8): 1030-1033.

Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomyrska, W. y Wiewiorowska, M. (1982). Mycotoxins in cereal grain, 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung*, 26: 1-7.

Choudhary, A.K. y Sinha, K.K. (1993). Competition between a toxigenic *Aspergillus flavus* strain and other fungi on stores maize kernels. *Journal of Stored Products Research*, 29: 75-80. Chulze, S.N., Ramírez, M.L., Torres, A. y Leslie, J.F. (2000). Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5312-5315.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E. y Dalcero, A.M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S5-S9.

Ciegler, A., Fennell, D.I., Sansing, G.A., Detroy, R.W. y Bennett, G.A. (1973). Mycotoxinproducing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology*, 26 (3): 271-278.

Bibliografía

Cleveland, T.E., Dowd, P.F., Desjardins, A.E., Bhatnagar, D y Cotty, P.J. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science*, 59 (6-7): 629-642.

Cotty, P.J., Bayman, D.S., Egel, D.S. y Elias, K.S. (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. En: *The Genus Aspergillus*. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 1-27.

Cotty, P.J. y Jaime-García, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 109-115.

Curtui, V.G., Gareis, M., Usleber, E. y Märtlbauer, E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 18 (8): 730-138.

Dalcerro, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G. y Rosa, C.A. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 19 (11): 1065- 1072.

Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi, A. (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61–67.

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E. y Dalcerro, A.M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19 (4): 408-414.

Deberghes, P., Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J.F., Krivobok, S., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. y Creppy, E.E. (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 11: 37–47.

Bibliografía

Degola, F., Berni, E., Dall'Asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I. y Restivo, F.M. (2007). A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (2): 409-417.

Kwok, S., Chang, S.Y., Sninsky, J.J. y Wang, A. (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, 3(4): S39-47.

Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V. y Ghorbel, A. (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (3): 376-379.

Lattanzio, V.M., Solfrizzo, M., Powers, S. y Visconti, A. (2007). Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (20): 3253-3261.

Leblanc, J.C., Tard, A., Volatier, J.L. y Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants*, 22 (7): 652-672.

Legarda, T. y Burdaspal, P. (2001). Presencia de ocratoxina A en muestras de pan comercializado en España y en muestras procedentes de doce países extranjeros. *Alimentaria*, Abril: 89-96.

Leong, S.L., Hocking, A.D. y Pitt, J.I. (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 83-88.

Leong, S.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S. (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (3): 209-216.

Bibliografía

Leong, S.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S. (2007). *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (1): 124-133.

Lieckfeldt, E., Meyer, W., Kuhis, K., y Börner, T. (1992). Characterization of filamentous fungi and yeasts by DNA fingerprinting and random amplified polymorphic DNA. *Belgian Journal of Botany*, 125: 226-233.

Link, J.H.F. (1809). *Observationes in Ordines plantarum naturales*. Gesellschaft für Natur (Berlín) 3, 1-42.

Livak, K.J., Flood, S.P.A., Marmejo, J., Giusti, W. y Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362.

López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. y González-Jaén, M.T. (2007). Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68 (2): 312-317.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. y Kikuchi, H. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438 (7071): 1157-1161.

Bibliografía

Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162 (3): 245-253.

Magan, N. y Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 131-139. Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. y Dalcerro, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179-184.

Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C.A. y Dalcerro, A.M. (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39 (4): 326-331.

Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. y Dalcerro, A.M. (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*, 161 (1): 53-58.

Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Chiacchiera, S.M. y Dalcerro, A.M. (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163 (5): 249-260.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. y Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (1): 129-135.

Makimura, K., Murayama, S. Y. y Yamaguchi, H. (1994). Specific detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species from respiratory specimens by polimerase chain reaction (PCR). *Japanese Journal of Medical Sciences and Biology*, 47: 141-156.

Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurtz, M. Zepnik, H., Mantle, P. Volkel, W., Hard, G.C. y Dekant, W. (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicological and Applied Pharmacology*, 206 (1): 43-53.

Bibliografía

Marr, J.S. y Malloy, C.D. (1996). An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus*, 12 (1): 7-24.

Martínez-Culebras, P.V. y Ramón, D. (2007) An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (2): 147-153.

Masoud, W. y Kaltoft, C.H. (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (2): 229-234.

Massoud, A.H., Derbalah, A.S. y Belal-el, S.B. (2008). Microbial detoxification of metalaxyl in aquatic system. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 20 (3): 262-267.

Mateo, R., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. (2004). An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: *An overview on toxigenic fungi and micotoxins in Europe*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. Págs. 219-235.

Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M, Mateo, F. y Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 79-83.

Mayer, Z., Färber, P. y Geisen, R. (2003). Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2): 1154-1158.

McMillan, L.K., Carr, R.L., Young, C.A., Astin, J.W., Lowe, R.G., Parker, E.J., Jameson, G.B., Finch, S.C., Miles, C.O., McManus, O.B., Schmalhofer, W.A., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Goetz, M., Tkacz, J.S. y Scott, B. (2003). Molecular analysis of two cytochrome P450 monooxygenase genes required for paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*, and effects of paxilline intermediates on mammalian maxi-K ion channels. *Molecular Genetics and Genomics*, 270 (1): 9-23.

Bibliografía

Medina, A., González, G., Sáez, J.M., Mateo, R. y Jiménez, M. (2004). Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (2): 261-267.

Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M. y Jiménez, M. (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4696-4702.

Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, F. y Jiménez, M. (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2): 196-203.

Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M. y Jiménez, M. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (3): 230-235.

Mégnégneau, B., Debets, F., y Hoekstra, R.F. (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics*, 23: 323-329.

Melin, P., Stratford, M., Plumridge, A. y Archer, D.B. (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology*, 154:1251-1257.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A. y Mliki, A. (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 245-250.

Bibliografía

Mellado, E., Díaz-Guerra, T.M., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J.L. (2001). Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7): 2431-2438.

Micheli P.A. (1729). *Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita*. Florencia, Italia. Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C. y González-Jaén, M.T. (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 213-221.

Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. y Magan N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (2): 439-445. MMWR Informe Semanal de Morbilidad y Mortalidad (Morbidity and Mortality Weekly Report) (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning- Eastern and Central provinces,

Kenya, January-July, 2004. *MMWR weekly*, 53 (34): 790-793.

Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6 (4): 245-252.

Mühlencoert, E. Mayer, I., Zapf, M.W., Vogel, R.F. y Niessen, L. (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 651- 659.

Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. y Visconti, A. (2006). Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 28-34.

Muture, B.N. y Ogana, G. (2005). Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. *East African Medical Journal*, 82: 275-279.

Bibliografía

Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A. y Ritieni, A. (2007). Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (25): 10499-10504. National Toxicology Program (1989). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies). National Toxicology Program Technical Report Series, 358: 1-142.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, EEUU. Pág. 193.

Ness, F., Lavellee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., y Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Sciences on Food and Agriculture*, 62: 89-94. Nesterov, V.S. (1951). Etiology, pathogenesis and clinical aspects of alimentary-toxic aleukia (septic angina). *Terapevticheskiĭ Arkhiv*, 23 (1): 88-94. Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38-46.

Nikkuni, S., Nakajima, H., Hoshina, S., Ohno, M., Suzuki, C., Kashiwagi, Y. y Mori, K. (1998). Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 44: 225-230.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2008). Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1727-1734.

O'Brien, E. y Dietrich, D.R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35 (1): 33-60. O'Callaghan, J., Caddick, M.X. y Dobson, A.D.W. (2003). A

Bibliografía

polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149: 3485-3491.

O'Callaghan, J. y Dobson, A.D.W. (2006). Molecular characterization of ochratoxin A biosynthesis and producing fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 227-243.

O'Callaghan, J., Stapleton, P.C. y Dobson, A.D.W. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 213–221.

Ochman, H., Gerber, A.S. y Hartl, D.L. (1998). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120 (3): 621-623.

Oelofse, D., Dubery, I.A., Meyer, R., Arendse, M.S., Gazendam, I. y Berger, D.K. (2006). Apple polygalacturonase inhibiting protein¹ expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry*, 67 (3): 255-263.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (1999). Basic Food Safety for Health Workers. World Health Organization, 99, Ginebra, Suiza. Pág. 25. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 906. Ginebra, Suiza. Pág. 70.

Otteneder, H. y Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17 (9): 793-798.

Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S. y Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: a 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 209-218.

Bibliografía

Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L. y Mahoney, N.E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164: 241-248.

Papachristou, A. y Markaki, P. (2004). Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 21 (1): 85-92.

Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25 (3): 244-263.

Pardo, E., Marín, S., Ramos, J. y Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention-a review. *Food Additives and Contaminants*, 23 (4): 398-410.

Parenicová, L., Suykerbyuk, M.E.G., Samson, R.A. y Visser, J. (1997). Evaluation of RFLP analysis for the classification of selected black *Aspergilli*. *Mycological research*, 101: 810-814.

Parenicová, L., Skouboe, P., Samson, R.A., Rossen, L. y Jaap, V. (2000). Molecular tools for the classification of black *Aspergilli*. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 413-424.

Parenicová, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R., Rossen, L., Hoor-Suykerbyuk, M.T. y Visser, J. (2001) Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 521-527.

Bibliografía

Pariza, M.Y. y Johnson, E.A. (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regular Toxicology*, 33: 173-186.

Parlamento Europeo (2002). Regulación 178/2002 del 28 de Enero de 2002. Principios generales de la legislación alimentaria - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - Procedimientos de seguridad alimentaria. *Official Journal of the European Communities*, L31. Págs. 1-24.

Park, J.W., Choi, S.Y., Hwang, H.J. y Kim, Y.B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (3): 305-314.

Passone, M.A., Resnik, S.L. y Etcheverry, M.G. (2005). In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B accumulation by peanut *Aspergillus section Flavi*. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (3): 682-691.

Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M.T., Mulé, G., Rodríguez, T., Vázquez, C. (2004). PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection*, 67 (6): 1278-1283.

Patthy, L. (1987). Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Letters*, 214: 1-7. Payne, G.P. y Brown, M.P. (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Reviews of Phytopathology*, 36:329–362.

Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Debets, A.J., Dekker, P., van Dijk, P.W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S., de Groot, P.W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P., van den Hondel, C.A., van der Heijden, R.T., van der

Bibliografía

Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J., Meulenbergh, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N., Ram, A.F., Rinas, U., Roubos, J.A., Sajt, C.M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J., Wedler, H., Wösten, H.A., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J., Visser, J. y Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25 (2): 221-231.

Perrone, G., Susca, A., Stea, G. y Mulé, G. (2004). PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 641-649.

Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. y Logrieco, A. (2006). Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1): 680-685.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. y Samson, R.A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Micology*, 59: 53- 66.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsubé, S., Tóth, B., Kozakiewicz, Z. y Samson, R.A. (2008). *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1032-1039.

Peterson, S.W. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus systematics*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 323-355.

Bibliografía

Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100 (2): 205-226. Petzinger, E., y Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, 76: 245-250.

Pfohl-Leszkowicz, A. y Manderville, R.A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (1): 61-99. Phillips, T.D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N.A., Ofori-Adjei, D., Jolly, P., Johnson, N., Taylor, J., Marroquin-Cardona, A., Xu, L., Tang, L. y Wang, J.S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 134-145.

Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. y Samson, R.A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 725-735.

Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2): 266-269. Pitt, J.I. (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter* 7: 1.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage Vol. II*. Academic Press, Sydney, Australia. Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, Suppl. 1: 17-22.

Pitt, J.I., Samson, R.A. y Frisvad, J.C. (2000). List of accepted species and their teleomorphs in the family Trichocomaceae. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 9-47.

Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149: 479-492. Plasencia, P. y Villalón, T. (2005). *Manual de los vinos de España*. Editorial Evergráficas, León, España. Págs. 32-33.

Bibliografía

Pointing, S.B. y Hyde, K.D. (2001). Bio-exploitation of Filamentous Fungi. Fungal Diversity Press, Hong Kong. Págs. 223-251. Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcerro, A. y Chulze S. (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (2): 131-135.

Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M. (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 100–112.

Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. y Desjardins, A.E. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 237-249. Ramírez, C. (1982). *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Holanda.

Ramos, A.J., Labernia, N., Marín, S., Sanchís, V. y Magan, N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract médium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 133-140.

Raper, K.B., y Fennell, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore. RASFF (2007). *Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2007*. Health and Consumer Protection Directorate-General, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo.

Rath, P.M. y Ansorg R. (2000). Identification of medically important *Aspergillus* species by a single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR amplified intergenic spacer region. *Mycoses* 43: 381-386.

Bibliografía

Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F., y Hassan, A.A. (1996). Detection of Ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by γ -radiation. *Applied Radiation Isotopes*, 47: 617-621

Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. y Sabaou, N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2): 85-92.

Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 3-10.

Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C. y Markham, A.F. (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Research*, 18 (10): 2887-2890.

Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, J., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W. y Nierman, W.C. (2007). What can comparative genomics tell us about species concepts in genus *Aspergillus*?. *Studies in Mycology*, 59: 11-17.

Römbke, J., Garcia, M.V. y Scheffczyk, A. (2007). Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53 (4): 590-598.

Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V. y Vaamonde, G. (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 115 (2): 140-143.

Roscoe, V., Lombaert, G.A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trelka, R. y Scott, P.M. (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Additives and Contaminants*, 25 (3): 347-355.

Bibliografía

Rosenthal, A. y Jones, D.S. (1990). Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 18 (10): 3095-3096. Russell, R. y Paterson, M. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41: 1467-1474.

Sáez, J.M., Medina, A., Gimeno-adelantado, J.V., Mateo, R. y Jiménez, M. (2004). Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1029: 125-133.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F. y Creppy, E.E. (2002). Fungal flora and Ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 1306-1311.

Sage, L., Garon, D. y Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (18): 5764-5768.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EEUU. Samson, R.A. (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. En: *Aspergillus: Biology and industrial applications*. Reed Publishing, Stoneham, Massachusetts, EEUU. Págs. 355-390.

Samson, R.A. (1994). Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* systematics. En: *Aspergillus*. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 1-22.

Samson, R.A. (2000). List of names of Trichocomaceae published between 1992 and 1999. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 73-79.

Samson R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M. y Frisvad, J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.

Bibliografía

Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C. y Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59: 129-145.

Sangare-Tigori, B., Dem, A.A., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Moukha, S. y Creppy, E.E. (2006). Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. *Human & Experimental Toxicology*, 25 (4): 211-216.

Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H. y Fungaro, M.H. (2006). PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157: 350-354.

Savelkoul, P.H., Aarts, H.J., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L., Schouls, L. y Lenstra, J.A. (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3083- 3091. Schaad, N.W. y Frederick, R.D. (2002). Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 250-258.

Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A. y Migheli, Q. (2005). Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD*, *aflO*, and *aflP* by reverse transcriptionpolymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and nonproducing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2): 201-210.

Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H. y Niessen, L. (2003) Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLPs. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 138-146.

Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F. y Niessen, L. (2004). Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5): 899-909.

Bibliografía

Schmidt-Heydt, M. y Geisen, R. (2007). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2): 131-140. BIBLIOGRAFÍA 209

Schmidt-Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R. y Magan, N. (2007). Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and otaPKS gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (3): 277-283.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284 (2): 142-149.

Schwartz, D.C. y Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75. Scott, P.M. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47: 489-499.

Scott, P.M. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on Ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, 13: 19-21. Seifert, K.A. y Gams, W. (2001). The taxonomy of anamorphic fungi. En: *The Mycota. Systematics and evolution Part A*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. Págs. 307-347.

Seifert, K.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1995). A critique of sequence analysis in the taxonomy of the filamentous ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73: S760-S767.

Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. y Aznar, R. (2008). Real-Time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 126-134.

Seo, J.A., Proctor, R.H. y Plattner, R.D. (2001). Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 34 (3): 155-165.

Bibliografía

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. y Venancio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 63-68.

Serra, R., Braga, A. y Venâncio, A. (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156 (4): 515-521.

Serra, R., Cabañes, F.J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulè, G. y Kozakiewicz, Z. (2006a). *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, 98 (2): 295-306.

Serra, R., Mendonça, C. y Venâncio, A. (2006b). Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S35-S39.

Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. y Salomón, R. (1996). Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3270-3273.

Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S. y Nihira, T. (2005). Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7): 3453-3457.

Shwab, E.K. y Keller, N.P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112: 225-230.

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. y Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 23 (6): 1087-1088.

Skaug, M.A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 16 (2): 75-78.

Bibliografía

Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A. y Phillips, D.H. (1992). Manual de Enfermedades de las Plantas. Mundi-Prensa, Madrid, España. Págs. 291-318.

Somashekar, D., Rati, E.R. y Chandrashekar, A. (2004). PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 101- 107.

Song, Z., Cox, R.J., Lazarus, C.M. y Simpson, T.J. (2004). Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 5 (9): 1196-1203.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.

Sreemannarayana, O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R. y Abramson, D. (1988). Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *Journal of Animal Science*, 66 (7): 1703-1711.

Stander, M.A., Bornscheurer, U.T., Henke, E. y Steyn, P.S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of Ochratoxin A. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 5736-5739.

Staunton, J. y Weissman, K.J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Products Reports*, 18 (4): 380-416.

Stefanovic, V., Toncheva, D., Atanasova, S. y Polenakovic, M. (2006). Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology*, 26 (1): 1-11.

Steyn, P.S., Holzapel, C.W. y Ferreira, N.P. (1970). The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 9: 1977-1983.

Stoev, S.D., Paskalev, M., MacDonald, S. y Mantle, P.G. (2002). Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53 (6): 481-487.

Bibliografia

Støren, O., Holm, H. y Størmer, F.C. (1982). Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4): 785-789.

Subramanian, C.V. (1972). The perfect states of *Aspergillus*. *Current Science*, 41: 755-761.

Sugita, C., Makimura, K., Uchida, K., Yamaguchi, H. y Nagai, A. (2004). PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*, 42: 433-437.

Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. y Kumagai, S. (2006). Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. *Journal of Food Protection*, 69 (6): 1365-1370.

Summerbell, R.C. (1993). The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (3): 572-577.

Susca, A., Stea, G., Mulè, G. y Perrone, G. (2007a). Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1154-1160.

Susca, A., Stea, G. y Perrone, G. (2007b). Rapid polymerase chain reaction (PCR)-singlestranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus section Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1148-1153.

Sutton, D.A., Fothergill, A.W. y Rinaldi, M.G. (1998). *Guide to Clinically Significant Fungi*. Williams & Wilkins. Baltimore, EEUU. Sweeney M.J. y Dobson A.D.W. (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175:149-163.

Sweeney, M.J., Pàmies, P. y Dobson, A.D. (2000). The use of reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. *International Journal of Food Microbiology*, 56 (1): 97-103.

Bibliografía

Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H. y Kushiro, M. (2007). Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 59-66.

Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A. y Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13 (3): 718-725. Thom, C. y Church, M.B. (1926). *The Aspergilli*. Williams and Wilkins, Baltimore, EEUU. T

13. Anexo I

Publicación en la Revista Científica ACTA MICROSCÓPICA. Caracas.Vol.26, Nº1, Año 2017, pp 21-31.ISSN: 0798 – 4545.Depósito Legal: p.p. 92 – 0073.

MM Herrera et. al. Caracterizaciones Estructurales y Ultraestructurales de los Componentes Granulares de Aspergillus Níger y Penicillium Cándidum y la Presencia de Melanina en las Fiálides.

CARACTERIZACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES DE LOS COMPONENTES GRANULARES DE *ASPERGILLUS NIGER* Y *PENICILLIUM CANDIDUM* Y LA PRESENCIA DE MELANINA EN LAS FIÁLIDES

M. M. Herrera^a, A. Molina^b, A. Blanco^a, C. Blanco^a, J. M. Navas^{a*}.

^aDepartment of Compared Anatomy and Pathology, University of Córdoba. Rabanales Campus. Faculty of Veterinary Carretera Madrid-Cádiz s/n, 14071 Córdoba, Spain

^bDepartment of Pharmacology, Toxicology and Forensic Medicine. University of Córdoba. Rabanales Campus. Faculty of Veterinary Carretera Madrid-Cádiz s/n, 14071 Córdoba, Spain

*Autor de correspondencia: JM Navas email: an3nallj@uco.es; phone: +34957218678; Fax: +34957 21 86 82

Recibido: Febrero 2017. Aprobado: Noviembre 2017.

Publicado: Diciembre 2017.

RESUMEN

En este trabajo hemos descrito con el microscopio óptico (MO) y microscopio electrónico de barrido (SEM) y transmisión (TEM), los diferentes componentes, vesículas, métulas, fiálides, conidios y esporas del *Penicillium candidum* y *Aspergillus niger*. Los hongos proceden de telas de cuadros, que se han visto afectados por su contaminación.

Como objetivos del trabajo, en primer lugar conocer la viabilidad de estos hongos contaminantes. Conocer la morfología a través de los estudios al MO y SEM y finalmente conocer la evolución mediante el análisis morfológico con el TEM. Por otro lado existen numerosas descripciones al MO y SEM de los componentes celulares de *Aspergillus* y *Penicillium*. En cambio son escasos e incompletos los estudios descriptivos que existen en la bibliografía consultada, con la utilización del TEM, de las células eucariotas de estos hongos, por lo que se puede considerar una importante aportación para su conocimiento y funcionamiento, sobre todo de las métulas y fiálides.

Es importante conocer las granulaciones que se presentan en las métulas y fiálides, que participan activamente en la defensa de estos hongos. Son granulaciones específicas y similares en ambos hongos, hay que señalar las granulaciones proteicas y de mediana densidad electrónica que presentan estas células y que definitivamente son las responsables de la producción de las envueltas de las esporas. En cambio existe una diferencia importante en las granulaciones de *Aspergillus niger* en comparación con *Penicillium*; en *Aspergillus* se produce granulaciones muy densas a los electrones y que se identifican con melanina, protegiendo selectivamente a este hongo.

Keywords: Fiálides, métulas, melanina, TEM, *Aspergillus*.

STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATIONS OF THE GRANULAR COMPONENTS OF *ASPERGILLUS NIGER* AND *PENICILLIUM CANDIDUM* AND THE PRESENCE OF MELANIN IN PHIALIDES

ABSTRACT

In this manuscript, we have described the different components, vesicles, metulae, phialides, conidia and spores of *Penicillium candidum* and *Aspergillus niger* with the scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The fungi come from plaid fabrics, which have been affected by their contamination.

As objectives of the work, firstly to know the viability of these contaminating fungi. To know the morphology through the studies with MO and SEM and finally to know the evolution through the morphological analysis with TEM. On the other hand there are numerous descriptions to MO and SEM of the cellular components of *Aspergillus* and *Penicillium*. In contrast, the descriptive studies that exist in the literature consulted, with the use of TEM, of the eukaryotic cells of these fungi are scarce and incomplete, so that it can be considered an important contribution for their knowledge and functioning, especially of the metulae and phialides.

One of the most important facts is to know the granulations that occur in the metulae and phialides, which participate actively in the defense of these fungi. As specific and similar granulations in both fungi, it is necessary to point out the proteinic and medium electron density granulations that these cells present and that are definitely responsible for the production of the spore shells. In contrast, there is a significant difference in the granulations of the *Aspergillus niger*

compared to the *Penicillium*; *Aspergillus* produces very dense granulations to the electrons and that are identified with melanin, which selectively protect this fungus.

Keywords: Phialides, metulae, melanin, TEM, *Aspergillus*.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los contaminantes biológicos que se encuentran en mayor cantidad en telas de cuadros, son hongos microscópicos y pólenes. El carácter saprofito y parasitario de los hongos microscópicos, utilizando los componentes orgánicos de las pinturas de las maderas y telas de los hienzo para crecer, producen alteraciones que pueden llegar a la degradación de los cuadros. Debido a que han estado normalmente en zonas desprotegidas y a veces a la intemperie, se favorece que los hongos, denominados de la humedad, fundamentalmente, sean los que contaminen a las telas de los cuadros [1]. Son muchos los hongos existentes que pueden realizar estos efectos, pero sin duda alguna el más numeroso es *Aspergillus niger* [2].

En los casos de degradación de las telas de cuadros por la acción de los hongos, resulta imprescindible realizar un diagnóstico y su posterior pronóstico [3]. El microscopio electrónico de barrido (SEM) se convierte en un medio ideal para descubrir la presencia de los hongos, ya que las esporas y las hifas se aprecian con estos microscopios. Pero estas identificaciones solo indican la presencia de los hongos contaminantes, no indicando el tipo de hongo del que se trata, y lo que es más importante, si se encuentran potencialmente activos, por lo que resulta muy importante realizar su identificación y conocer su viabilidad [4].

Señ muchos los estudios que existen con el MO y SEM, que han sido utilizados para estudiar sus componentes celulares [5][6]. Con el uso del TEM se conocen la morfología íntima de dichos componentes, si bien existen descripciones de los conidios y las esporas, pero son escasos los estudios de las vesículas, de las metulas y hifales.

El *A. niger* se define por su coloración negra de su conidióforo y se debe a la presencia de melanina, fundamentalmente en sus hifales. La melanina en el mundo animal se considera como una sustancia de protección, disponiéndose en las zonas más periféricas y externas [7]. Diversos autores sugieren que la melanina favorece la virulencia de los agentes micóticos [8], y además los protegen de la respuesta de defensa del hospedador, y de los agentes oxidantes, reduciendo su fagocitosis por parte del hospedador [4][9].

La melanina se produce en el proceso de crecimiento y maduración del hongo de las que destacan últimamente *Aspergillus fumigatus*, pero por los que muestran una coloración específicamente negra en su evolución y crecimiento es *A. niger* [10][11].

Penicillium marneffei también se caracterizan por producir melanina. Pero la mayoría de ellos entre los que destaca *Penicillium carolinense* carecen de melanina.

Uno de los objetivos principales que nos planteamos, es conocer cómo las propias células de los conidióforos, participan en producir diferentes sustancias que el propio hongo utiliza para su propia protección, y que lo producen células intermedias como las metulas y las hifales. Estas sustancias protectoras la producen estas células almacenándolas en gránulos irregulares, y posteriormente formarán las envoltas de protección de las esporas. Pero además en *Aspergillus niger*, se sintetizan gránulos de melanina, que es la responsable del color negro de estos *Aspergillus*. Esta melanina protege de las radiaciones luminosas.

También nos hemos planteado describir con microscopio electrónico de transmisión (TEM) de sus componentes, debido a que hay escasez de estos estudios microscópicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado hongos procedentes de varios lienzos de Valdés Leal, que estaban deteriorados y se iba a proceder a su restauración, encontrándose ésta en los pasos iniciales (Fig. 1a).

Tomadas las muestras, los hongos se cultivaron en agar Sabouraud glucosado y en Agar Czapek-Dox, éste último como cultivo específico para *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*.

Se utilizaron como métodos de detección de *Aspergillus*, por un lado, el test PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag (Ref 62794; BIO-RAD; USA) según las indicaciones del fabricante; por otro lado, se realizó diagnóstico molecular de DNA genómico con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCRrt), utilizando el suero ASPERGILLUS SSP Q-PCR ALERT AMPLIPROBE (Ref RTS110-P; NANOGEN; Italy) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo SmartCyclerR (Mycostonica; UK). Con respecto a la detección de *Penicillium candidum* se utilizó el kit *Penicillium sp*. TaqMan PCR (Ref TM33200, Norgen Biotek Corp., Canada) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los hongos para su estudio se dispusieron en 2 lotes o grupos, dependiendo de la especie del hongo:

Primer grupo de hongos *Penicillium candidum* cultivados a los 10 días.

Segundo grupo de hongos *Aspergillus niger* cultivados a los 10 días.

Para su estudio y descripción hemos seguido diferentes metodologías, utilizando tanto el microscopio óptico (MO) y el electrónico de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

Para conocer su momento de desarrollo realizamos unas improntas de los cultivos teñidas con azul de metileno.

Para su estudio al microscopio óptico, las colonias fueron fijadas en formol al 4%, e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor, y posteriormente los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. También se

realizaron improntas en los porta y fueron teñidas con azul de metileno.

Para su observación al microscopio electrónico las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2%. Las correspondientes al SEM se desecaron y se recubrieron con oro coloidal, en tanto que para TEM se incluyeron en resimas y tras su corte se contrastaron con acetato de plomo y citrato de uranio.

Los estudios morfométricos se realizaron con TEM, se realizaron contando 10 cuadrados de cada rejilla, que suponen 10x10,000 y son 100,000µm² la superficie medida.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.11[®] (Statgraphics.net; Madrid, Spain) para determinar la diferencia del tamaño de las hifas y mótulas entre los dos hongos estudiados. ANOVA (prueba F) fue aplicada para demostrar si existían diferencias significativas entre los valores. $p < 0.05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a las escasas descripciones existentes al microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las células que forman los conidióforos, vamos a realizar las descripciones de todos los componentes celulares de *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, con las diferentes microscopías pero fundamentalmente al TEM.

Primer grupo. Cultivo de *Penicillium candidum*

Macroscópicamente producen unas colonias bien desarrolladas, con uniformidad en el color, que son de color blanco nacarado y nunca muestra zonas negras (Fig.1b).

El componente esencial de estos hongos son los conidióforos, formados por un tallo y la cabeza penicilar. En este grupo se destaca que existe un pleomorfismo en

los conidióforos, intercalándose de pequeño y grandes tamaños (Figs. 1d, 2a)

Para identificar a todos los elementos nos hemos basado en su disposición topográfica y en su morfología.

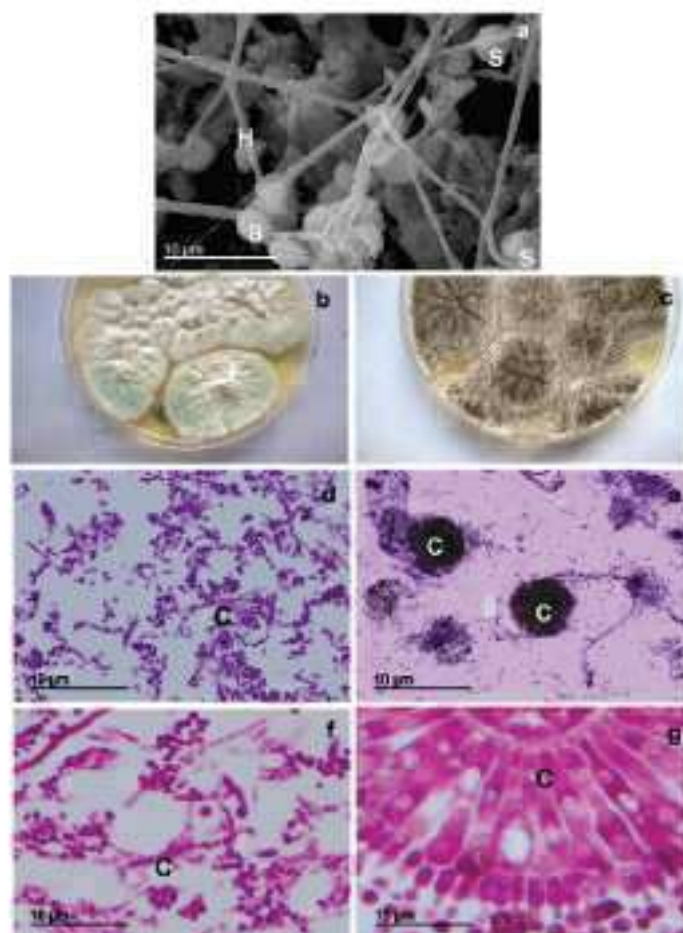


Fig. 1. a. Superficie de la pintura, en la que las hifas (H) y las esporas (E) se presentan bajo SEM. b. Cultivos de 10 días de colonias de *P. candidum* (C). c. Cultivos de 10 días de colonias de *A. niger* (C). d. Frotis de colonias de *P. candidum*, observando conidióforos grandes (C) y pequeños (c). e. Frotis de colonias de *A. niger*, observando conidióforos grandes y uniformes (C). f. Detalle al OM de conidióforos altamente pleomórficos (CP). H-E. Barra de 10 μ m. g. Detalle al OM de conidióforos grandes y uniformes (C). H-E.

Tallo

Está formado por un tallo único, muy grueso y liso, sin que tenga ramificaciones y termina en una floración a modo de copa de vesículas y células eucariotas (Fig. 1f).

Al microscopio óptico se aprecia un contenido citoplasmático irregular con grandes depósitos líquidos, encerrados en grandes vacuolas (Fig. 2c). Su estudio al TEM corresponde a un conjunto de células eucariotas con escasa actividad celular, encontrándose separadas entre sí por un espacio libre que corresponden a una

segmentación septal. La membrana celular es lisa y está envuelto en capas irregulares de proteínas. Son células grandes y alargadas, cuyo citoplasma contiene sobre todo residuos citoplasmáticos, con un núcleo de pequeño tamaño. En las zonas de separación entre las células existen restos de citoplasma y en los bordes de separación, pueden ser lisos en los casos que haya concluido la citocinesis celular o con uniones densas de membrana en los que aún no ha concluido la última fase de la división.

Vesículas

Están formadas por células eucariotas, que se caracterizan por presentar una membrana simple, el núcleo pequeño y denso, y lo que más se destaca es un citoplasma, que se caracteriza por que la mayoría de él contienen los orgánulos como son mitocondrias, retículo endoplásmico y complejo de Golgi y junto a ellas se localizan el núcleo. El resto de citoplasma está ocupado por gruesas vacuolas líquidas (Fig.2c).

Métulas

Formadas por células eucariotas, que se dividen por mitosis y se disponen a modo de una estrecha banda de células que se localizan topográficamente entre las vesículas y las fiálides. Estos componentes suelen estar en escaso número, y se presentan en tanto la fase mitótica y vegetativa.

Es frecuente observarlas en división mitótica, alargándose y con dos polos, donde encontramos los núcleos que pueden estar mostrando los cromosomas. Cuando se aprecian los cromosomas estos están poco organizados y tienen escasa densidad electrónica, dándose los casos que dichos núcleos pueden estar en momentos diferentes, es decir uno organizado y el otro mostrando los cromosomas.

En la fase vegetativa, las métulas son esféricas de unos 3 μm de diámetro (Fig.2g), y al TEM son claras y de escasa densidad. Tienen un núcleo esférico y grande, que ocupa gran parte del citoplasma y muestra una envoltura nuclear dilatada con abundantes poros, y con un perfil irregular de bordes dentados, y de cromatina clara y homogénea, este hecho nos facilita la identificación de

estos componentes. El citoplasma es escaso, y tiene pocos orgánulos, apreciándose ribosomas y algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, y también se destaca mitocondrias que son escasas pero tienen un gran desarrollo. Finalmente destacamos que son células poco diferenciadas, y con escasa cantidad de sustancias metabólicas.

Fiálides

Estas células eucariotas son las responsables esenciales en la formación de las células reproductoras. Se disponen en cúmulos a modo de mosaico y posteriormente en hileras. Estas células se caracterizan por presentar granulaciones, gránulos de naturaleza proteica de grandes proporciones y de escasa densidad electrónica. La presencia de estos gránulos son las responsables de producir las envueltas proteicas de los conidios.

Las fiálides más cercanas a las métulas carecen de granulaciones y se denominan agranuladas (Fig.3a). Inicialmente carecen de gránulos que aparecen posteriormente. Tienen un tamaño alrededor de 5 μm de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaico, relacionados entre sí por una fina membrana. Son células ovoides o piriformes. Tiene un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones (Fig.3e). El citoplasma a pocos aumentos es uniforme e incluso de la misma densidad que el núcleo. Todas las fiálides también se presentan en mitosis (Fig.3e).

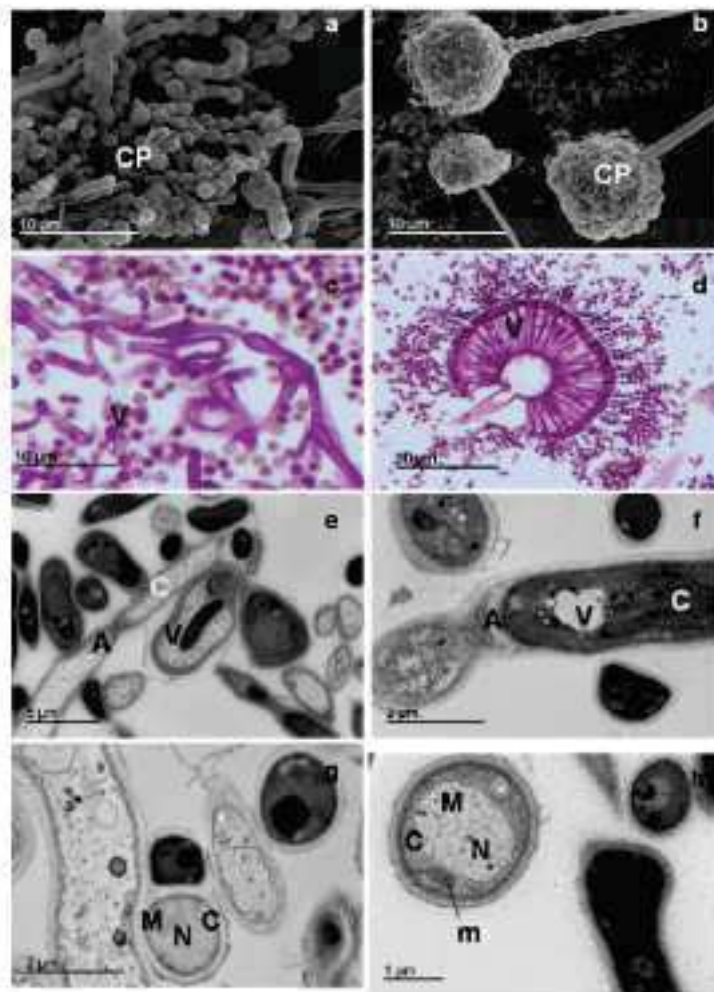


Figura 2. **a.** Detalle al SEM. Se pueden observar las cabezas pleomórficas de *Penicillium* (CP). **b.** Detalle al SEM. Se pueden observar abundantes cabezas de *Aspergillus*, grandes y uniformes (C). **c.** Detalle al OM del *P. candidum*. Se observaron vesículas (V) en la cabeza de *Penicillium*. PAS. **d.** Detalle bajo OM del segundo grupo. Se destacaron las vesículas largas (V) dispuestas en empalizada, con áreas PAS positivo. **e.** Detalle bajo TEM de *Penicillium*: vesículas alargadas (V) con contenido citoplasmático (C) y zonas amorfas (A). **f.** Detalle al TEM de *Aspergillus*: vesículas alargadas (V) con un contenido citoplasmático (C) y apenas zonas amorfas (A). **g.** Detalle al TEM del primer grupo. Una métula esférica (M) con un núcleo claro (N) rodeado por un pequeño halo de citoplasma (C). **h.** Detalle al TEM del segundo grupo. Se observó una métula (M) con un núcleo claro (N) y un nucléolo prominente. El halo citoplasmático contenía mitocondrias (m) y gránulos amorfos (C).

Conidios

Son células de pequeño tamaño, de formas esféricas a ovoides, y suelen disponerse relacionadas entre sí a modo de hileras. Morfológicamente se configuran por dos componentes, el interno que corresponde a una pequeña célula eucariota, con escasos organoides, y las correspondientes cubiertas. En las cubiertas recién formadas, se destaca una densa y fina envuelta, que proviene de los gránulos densos de las filiales que

posteriormente son excretados y organizan una membrana continua, homogénea y clara, con pequeñas espículas externas que se aprecian tanto al SEM como al TEM.

Esporas

Son muy numerosas, esféricas a ovoides, de superficie espiculada (Fig.3g). Están configuradas por dos elementos, el interno que es una célula eucariota que en

fases iniciales apenas tiene desarrollo, y que finalmente apenas se diferencian sus componentes, al tener todos ellos una densidad intensa y de contornos inapreciables. Y en segundo lugar las cubiertas externas, que si se

observan recién formadas encontramos una interna densa a los electrones, y la más externa clara y con espículas externas. Estas cubiertas terminan fundiéndose y dan una o varias, de morfología similar y escasa densidad.

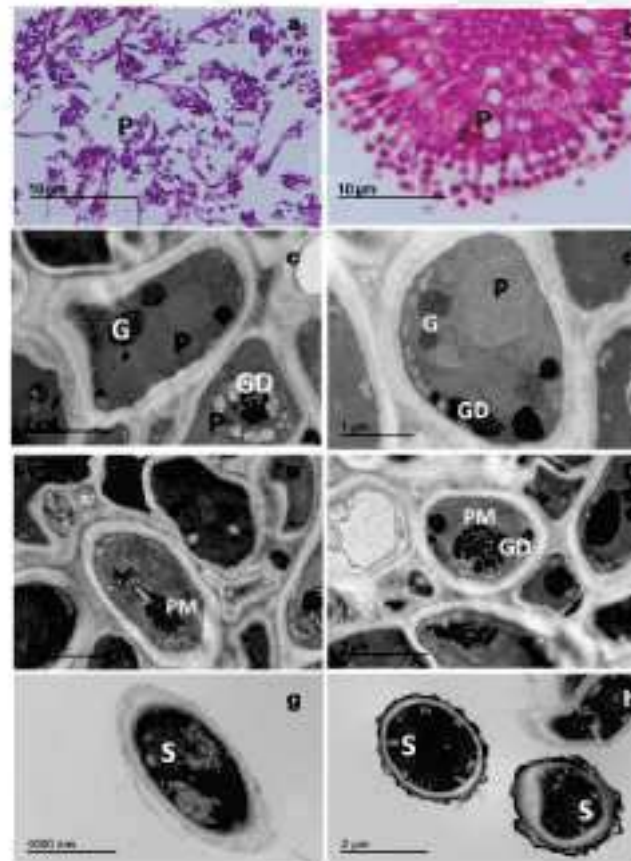


Fig. 3. **a.** Detalle al OM de la cabeza de *Penicillium*. Se observan pocos fiálides granuladas (P). **b.** Detalle bajo OM de la cabeza de *Aspergillus*. Pueden verse abundantes fiálides pigmentadas (PP). **c.** Detalle bajo TEM del primer grupo. Se puede observar fiálides (P) con un núcleo grande, uniforme y denso, con mitocondrias y gránulos de proteína (G) en su citoplasma. **d.** Detalle bajo TEM del segundo grupo. Las fiálides (P) muestran su núcleo excéntrico y en su citoplasma tienen dos tipos de gránulos, algunos de baja densidad (G) y otros son de alta densidad y más numerosos (GD). **e.** Detalle bajo TEM del primer grupo, con fiálides en la fase de división mitótica (PM). **f.** Detalle bajo el TEM del segundo grupo con un fiálide en mitosis (PM), y en su citoplasma se ven gránulos densos de melanina (GP). **g.** Detalle al TEM de esporas de *Penicillium* (S). **h.** Detalle bajo TEM de esporas de *Aspergillus* (S).

Segundo grupo. Cultivo de Aspergillus niger.

En nuestro trabajo hemos estudiado como segundo grupo de investigación, *Aspergillus niger* con 10 días en el medio de cultivo (Fig. 1c).

Como en el caso anterior la parte esencial de los conidióforos están formados por un tallo y la correspondiente floración de la cabeza aspergilar, con la característica de que son uniformes, de grandes tamaños

y de un color negro intenso (Figs. 1e, 2b). Todos los componentes que forman los conidióforos están presentes en la cabeza aspergilar y tienen la misma morfología, a excepción de las fiálides, que en definitiva son las responsables de la coloración negra de las colonias (Fig. 1g). Por lo que el tallo, las vesículas, las méntulas, los conidios y las esporas son similares a las

estudiadas anteriormente, vamos a describir solamente las fiálides por sus diferencias morfológicas.

Fiálides

Estos componentes son más numerosos, y se disponen en hileras y también en mosaicos (Fig.2d). Estas células eucariotas, se pueden dividir por su morfología y composición en dos grupos; las fiálides granulares y las fiálides pigmentadas. Ambas células las encontramos en fase de mitosis y en fase vegetativa.

Fiálides granulares

Estas fiálides son las más jóvenes y tienen un tamaño alrededor de 5 μm de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaico, relacionados entre sí por unas finas membranas. Son células ovoides o piriformes y tienen un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones. El citoplasma es uniforme e incluso tienen más densidad que el núcleo, con numerosos ribosomas y algunas cisternas de retículo rugoso, y también mitocondrias de densidad similar al citoplasma pero con abundantes crestas (Fig.2h). Algunas de estas células eucariotas, las hemos encontrado en división celular, mostrando todas las fases de las placas mitóticas, si bien los cromosomas están poco individualizados, y se disponen como acúmulos de cromatina densa. En su citoplasma se aprecia gránulos de escasa densidad que participarán en la formación de las cápsulas de los conidios (Fig.3d).

Fiálides pigmentadas

Las fiálides pigmentadas son muy similares a las anteriores, aunque con dos diferencias esenciales, por una parte, son de mayor tamaño de alrededor de 6 μm de diámetro, y sobre todo la existencia en el citoplasma de varios gránulos como los anteriores, pero sobretodo gránulos muy densos, de grandes proporciones, y formados exclusivamente por material muy denso y

homogéneo (Fig.3b). Estas últimas granulaciones las identificamos como melaninas que serán las responsables de la coloración negra de las colonias. Y al microscopio óptico le da una coloración parda de su citoplasma. Son frecuentes las divisiones mitóticas (Fig.3f). Los conidióforos y las esporas son similares a las descritas en el grupo anterior (Fig.3h).

Análisis estadístico

En el estudio morfométrico se ha estudiado el tamaño de las fiálides y las métulas de cada hongo, comparando sus medias. Con respecto al primer elemento (fiálides) observamos que existe una diferencia significativa entre el tamaño de las fiálides de *P. candidum* y *A. niger* ($p < 0.05$) (Fig.4). Con respecto a las métulas observamos que no existe diferencia significativa entre el tamaño de las métulas de *P. candidum* y *A. niger* ($p > 0.05$) (Fig.5).

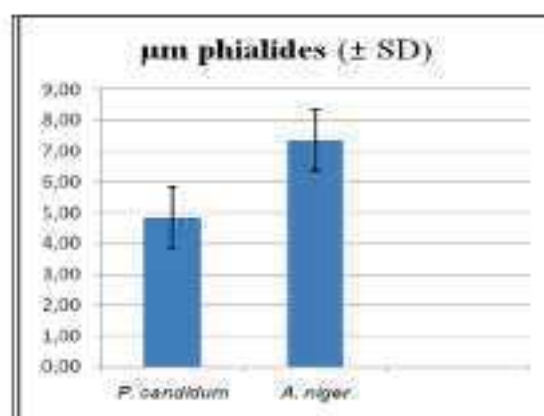


Fig. 4. Representación gráfica de la variación del tamaño de fiálides en cada uno de los lotes. Los tamaños medios de fiálides, fueron significativamente mayores en el grupo *A. niger*. Significativamente diferente del grupo *P. candidum* con $p < 0.05$.

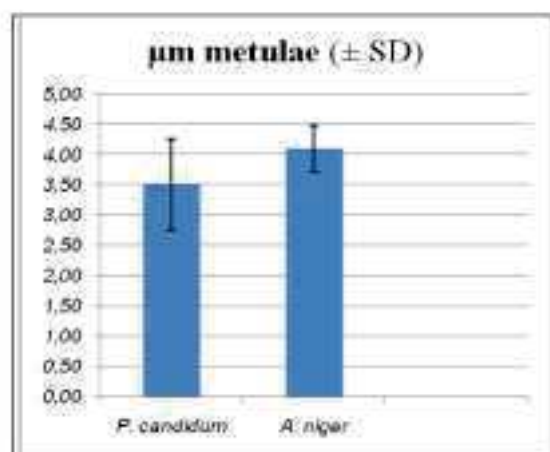


Fig. 5. Representación gráfica de la variación del tamaño de las metulas en cada uno de los lotes. Los tamaños medios de las metulas no fueron significativamente mayores en el grupo *A. niger*. No significativamente diferente del grupo *P. candidum* con $p > 0,05$.

Uno de los objetivos del presente trabajo, ha sido realizar una descripción de los componentes celulares del *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, identificarlos previamente y realizar un análisis funcional entre los diferentes componentes [2][12][13]. Existen diferentes estudios realizados con el microscopio óptico y electrónico de barrido (SEM) [6], en tanto apenas existen identificaciones y descripciones de estos elementos al microscopio electrónico de transmisión (TEM), por lo que consideramos que uno de los puntos esenciales de nuestro trabajo son los estudios ultraestructurales, que nos ha permitido conocer su morfología íntima, y comprender su función en el metabolismo general de estos hongos. Por otra parte, este trabajo ha permitido no solo conocer los componentes que aislamos de las telas de los cuadros, las esporas e hifas, sino que tras su cultivo nos ha permitido su identificación y conocimiento de su viabilidad y pronóstico para realizar la restauración de los cuadros afectados.

En nuestras investigaciones se identificó *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum* [14][15], y el motivo de realizar sus estudios tanto al microscopio óptico como al electrónico, y sobre todo al TEM, es identificar todas las células eucariotas que se forman en los conidióforos y realizar la descripción de la estructura y ultraestructura

de dichas células, para su identificación y su posterior comprensión de su funcionalidad [1].

Lo primero que hemos tenido en cuenta es la viabilidad de estos hongos en las telas de los cuadros alterados, y el hongo que preferentemente predomina es *Aspergillus niger* [4], que se caracteriza por ser uno de los que están más relacionados con la humedad, y mantenerse activos en dichas localizaciones.

Tanto al MO como al SEM, existen estudios previos que nos han permitido no solo su identificación sino el conocimiento de sus componentes celulares [6]. En tanto que al existir escasos trabajos al TEM, y los que existen son incompletos, nuestras descripciones han sido nuestra mayor aportación al conocimiento de estos hongos. El hecho de ser escasos e incompletos los trabajos al TEM, solo los hemos podido usar en el estudio de algunas de sus células como son los conidios y esporas.

Hemos comprobado al TEM, que los septos de las hifas, corresponden a fases de citocinesis de la mitosis, en las que se han producido una separación de las células hijas, o pueden mantener puntos de uniones. Con el MO también se aprecian con nitidez las septaciones, debido al contenido citoplasmático de las células hijas y sobre todo por la existencia de membranas de separación muy gruesas [3].

Las células correspondientes a las vesículas, que se inician en el cono, se disponen de forma radial y tiene forma alargada, inician la disposición radial del resto de componentes. Estas células tienen una pared rígida y su componente celular es alargado y está rodeado de espacios claros. La existencia de escasas mitosis, con escasos cromosomas, indica que su división mitótica para producir las metulas es muy rápida.

Los estudios realizados al TEM de las metulas, indican que estos componentes son de transición, y carecen de relevancia funcional, como indican sus escasos organelos citoplasmáticos y su presencia es corta como indican las mitosis que darán paso a la formación de las filídes.

Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforos, las células eucariotas que tienen mayor actividad funcional son las filídes. Por una parte el gran número de mitosis que hemos observado indica un aumento en el número de células que posteriormente se transformarán en los conidios, y que no solo actúa como una zona germinal, sino que, al contrario, sus numerosos componentes citoplasmáticos facilitarán la formación de los conidios e incluso darle la coloración negra a las colonias en el caso *A. niger* [8]. Dentro de las granulaciones existentes se desprende dos funciones importantes, en primer lugar, los gránulos proteicos claros, tienen una clara función de producir las envueltas de los conidios y posteriormente las esporas. Y en esta formación de los gránulos proteicos participa fundamentalmente su retículo rugoso. Y en segundo lugar los gránulos muy densos corresponden a melanina. De las descripciones que hemos realizado tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión, se deduce que la coloración negra de las colonias se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las filídes pigmentadas [9][10]. Hemos podido comprobar que en aquellos conidióforos cuyas filídes contienen más pigmento se traduce en una mayor coloración de las colonias [5]. En las colonias jóvenes en las que su coloración es homogénea y apenas oscura, indica que la melanina es escasa y está distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo, macroscópicamente el aumento del color negro y su disposición central en la colonia, parece indicar que los conidióforos tienen un mayor número de filídes pigmentadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias [7].

Melanina

Las filídes para poder realizar todos los mecanismos de maduración, tienen una disposición especial, de ahí que presenten una disposición a modo de mosaico, en la fase

de síntesis de las granulaciones, y en hileras cuando están en fase de transición a los conidios. Los conidios junto a las filídes son los componentes más numerosos de los conidióforos. Sus componentes citoplasmáticos confirman que se tratan de células de maduración para la formación de las esporas, por eso para facilitar la expulsión de las esporas de los conidióforos, los conidios se disponen en hileras de diversa longitud, en la que se aprecia una maduración tanto de núcleo como citoplasma.

CONCLUSIONES

Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* desarrollan en las méticas y filídes con gránulos densos, que son precursores de las envueltas de las esporas, observados con TEM.

Aspergillus produce en las méticas y filídes melanina, que participa en la coloración y defensa del propio hongo, apreciándose con TEM.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por los grupos de investigación PAIDI BIO-218 "Histología e Histomorfometría" y PAIDI AGR-101 "Anatomía y Embriología" de la Universidad de Córdoba en el Plan Andaluz de Investigación. Los autores también están agradecidos al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI), en su Servicio de Asesoramiento Científico Microscopía Electrónica, Universidad de Córdoba, por su colaboración en este estudio. No hay conflicto de intereses que declarar.

REFERENCIAS

- [1] Van de Vondervoort P, B Poulsen, G Ruijter, T Schults, J Visser, JIversen. (2004). "Isolation of a fluffy mutant of *Aspergillus niger* from chemostat culture and its potential use as a morphological stable host for protein production". *Biotechnology and Bioengineering* 86: 301-307.

- [2] Loudon KW, APCoke, JP Burnie, AJShaw, BA Oppenheim, CQ Morris. (1996) "Kitchens as a source of *Aspergillus niger* infection". *Journal of Hospital Infection* 32: 191-198.
- [3] Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijk. (2002). "On the safety of *Aspergillus niger* – a review". *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 426-435.
- [4] Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd. (2007). "Effect of nutrient availability on hyphal maturation and topographical sensing in *Aspergillus niger*". *MycoScience* 48: 145-151.
- [5] Kusters-van Someren MA, RA Samson, JVisser. (1991). "The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate". *Current Genetics* 19: 21-26.
- [6] Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes. (1999) "New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate". *FEMS Microbiology Letters* 180: 191-196.
- [7] Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung. (1998). "The developmentally regulated *ALB1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence". *Journal of Bacteriology* 180: 3031-3038.
- [8] Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton. (2004). "Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*". *J Med Microbiol.* 53: 175-181. 10.1099/jmm.0.05421-0.
- [9] Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhukdi, AA Brakhage.(1997). "Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence". *Infect Immun.* 65: 5110-5117.
- [10] Jacobson ES. (2000) "Pathogenic roles for fungal melanins". *Clin Microbiol Rev.* 13: 708-717. 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.
- [11] Hamilton AJ, BL Gomez. (2002). "Melanins in fungal pathogens". *J Med Microbiol.* 151: 189-191.
- [12] Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. (1985). "Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium*". In: Samson RA y JI Pitt (Eds.) *Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics*". New York: *Plenum Press*: 71-82.
- [13] Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd. (2014) "Regulation of vectorial supply of vesicles to the hyphal tip determines thigmotropism in *Neurospora crassa*". *Fungal Biology* 118(3): 287-294.
- [14] Veitami, M, VK Vijayan, MK Agarwal. (2015). "Identification of *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. niger*) Allergens and Heterogeneity of Allergic Patients' IgE Response". *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 14(4), 361.
- [15] Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS Meor-Hussin. (2016). "Response Surface Methodology Modelling of an Aqueous Two-Phase System for Purification of Protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/T031) under Solid State Fermentation and Its Biochemical Characterization". *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1872.