

Aislamiento del Moho *Penicillium candidum* a partir de un Queso Tipo Brie, Fabricado por la Procesadora de Alimentos Universitaria (P.A.U) “Lácteos Santa Rosa A.C”.

www.bdigital.ula.ve

Yelisbeth A. Minorta.

Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de los Andes

Co-Tutora: Prof. Aura Marina González.

Co-Tutor: Prof. Rubén Gómez.

Mayo, 2021

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a Dios por darme vida, salud y permitirme culminar este proyecto

A mi madre y padre, por brindarme su respaldo y apoyo

A mi hermana por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional

A Eliud por su valioso y desinteresado respaldo

A la empresa Productora de Alimentos Universitaria, Lácteos Santa Rosa, por abrirme sus puertas e impartir su aprendizaje.

A los tutores Prof. Aura María Gonzales y Prof. Rubén Gómez por su guía y orientación.

A la Prof. Aida de Lima por su ayuda incondicional, en el desarrollo del proyecto

Al Prof. Cesar Izaguirre por toda la orientación, educación y apoyo en el área de microbiología.

A Víctor por hacer amena mi estadía en el Laboratorio de Alimentos

A Natacha por compartir conmigo, sus conocimientos en las técnicas empleadas en el área de microbiología.

A Yenifer Moreno, por su apoyo y colaboración

Gracias a todos por sus consejos y enseñanzas.

Yelisbeth Minorta

Índice

Resumen.....	5
Introducción	6
Capítulo I	9
Planteamiento del Problema.....	9
Objetivos	10
<i>Objetivo General</i>	10
<i>Objetivo Específicos</i>	10
Justificación.....	11
Capítulo II.....	13
Marco Teórico.....	13
<i>Antecedentes de la Investigación</i>	13
<i>Reinos de la Naturaleza</i>	17
<i>Hongos</i>	19
Hongos Filamentosos o Mohos.....	20
El Micelio.....	21
Reproducción.....	24
Condiciones de Crecimiento.....	28
Curva de Crecimiento de Hongos Filamentosos.....	29
Procesos Metabólicos en Los Hongos.....	30
Requerimientos Nutricionales de Hongos Filamentosos.....	34
Clasificación de Los Hongos.....	34
Ascomycota.....	39
Penicillium.....	40
Penicillium candidum.....	43
<i>Medios de Cultivo</i>	45
Agar Extracto de Malta.....	47
Agar Papa Dextrosa.....	47
Agar Arroz.....	48
Agar Cloranfenicol.....	48
Agua Peptonada.....	49

<i>Métodos de Siembra</i>	50
<i>Laminocultivo</i>	54
<i>Estudio Morfológico de Hongos Filamentosos</i>	55
<i>Estudio Fisiológico de Moho Penicillium candidum</i>	55
<i>Estudio de Capacidad Proteolítica y lipolítica de las Cepas del moho Penicillium candidum.</i>	59
<i>Métodos de Conservación de Hongos Filamentosos</i>	60
<i>Queso Brie</i>	63
Requisitos Físicoquímicos del Queso Brie.	64
<i>Propiedades Organolépticas</i>	65
Capítulo III.....	67
Metodología Experimental.....	67
<i>Toma de Muestra, Transporte y Almacenamiento del Queso Tipo Brie de Lácteos Santa Rosa</i>	69
<i>Preparación de los Medios de Cultivo</i>	69
<i>Preparación de la Muestra e Inoculación de la Muestra en los Medios de Cultivos.</i>	79
<i>Elaboración de Laminocultivos</i>	84
<i>Caracterización Morfológica</i>	86
<i>Almacenamiento y Conservación del Moho Penicillium candidum Aislado</i>	87
Capítulo IV.....	88
Resultados y Discusiones	88
Conclusiones.	107
Recomendaciones.	108
Referencias.....	109
Apéndice	115
Apéndice A.....	115
Apéndice B	116
Apéndice C.....	118

Resumen.

Entre la gran variedad de quesos que existen, se encuentra el queso Brie, el cual es un queso madurado, que obtiene su cremosidad característica por la acción del moho *Penicillium candidum*. La Procesadora de Alimentos Universitaria (P.A.U), “Lácteos Santa Rosa A.C” emplea en la preparación de este queso, el moho liofilizado, pero en vista de las dificultades que presenta adquirir este producto debido a su alto costo, surgió la importancia de desarrollar un trabajo de investigación que permitiera aislar el moho *Penicillium candidum* de un queso tipo Brie, fabricado por Lácteos Santa Rosa, para luego ser usado en la elaboración de dicho queso. Para ello se implementó una metodología de aislamiento y caracterización morfológica del hongo *Penicillium candidum*, basada en la metodología propuesta por López, et al. (2010). Que consistió en la siembra en medios específicos de Agar extracto de Malta (AEM); Agar Papa dextrosa (PDA); Agar Extracto de levadura, glucosa, florfenicol (YGF) y Agar arroz al 20% (AA). En la primera siembra el AEM, resultó ser eficiente para el aislamiento del moho y en la segunda siembra en los Medios de Cultivo PDA y YGF, se evidenció un mayor crecimiento en comparación con AA y AEM, en condiciones de incubación de 28°C por 7 días. Sin embargo, al cambiar las condiciones en AEM, a 18°C por 6 semanas e incrementar la humedad relativa a 80,5%; se obtuvo en la caracterización micromorfológica un crecimiento de la estructura vegetativa y reproductiva, logrando identificar el moho *Penicillium candidum* con claves taxonómicas.

Palabras claves: *Penicillium candidum*, Aislar, Siembra, Incubación, Caracterización Morfológica.

Introducción

La leche es un producto alimenticio, valioso por sus aportes en la nutrición de las personas, ya que está constituida por agua, grasas, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales. Sus derivados presentan una forma más estable, con una vida de anaquel mucho mayor, siendo algunos de estos el queso, yogurt, mantequilla, suero, natilla, entre otros.

El queso es un producto que resulta de la precipitación de las caseínas por medio de la renina o por acidificación alcanzando el punto isoeléctrico de las caseínas. Estos se pueden clasificar como quesos frescos, de pasta blanca, pasta firme y pasta dura.

Entre los quesos de pasta blanda, se encuentra el queso Brie, el cual es originario de Francia. Durante su elaboración se emplea el moho *Penicillium candidum*, el cual actúa en el transcurso de la maduración de este exquisito queso proporcionándole su cremosidad característica. En la Industria Procesadora de Alimentos, Lácteos Santa Rosa, se elabora un queso tipo Brie empleando *Penicillium candidum* liofilizado, pero debido a los altos costos que tiene este moho y la importancia que tiene en la maduración del queso Brie, surge la necesidad de llevar a cabo un trabajo de investigación que permita realizar un Aislamiento del *Penicillium candidum* a partir de una muestra de queso tipo Brie, fabricado por Lácteos Santa Rosa, para luego ser implementado en la elaboración de este Queso.

Con el fin de alcanzar el objetivo general, el cual consiste en Aislar el Moho *Penicillium candidum* de un Queso Tipo Brie, fabricado en la Productora de Alimentos Universitaria (P.A.U) “Lácteos Santa Rosa A.C”, se plantean los específicos y para alcanzar los mismos se realizó una revisión bibliográfica en la cual se tomaron como antecedentes trabajos de investigación como el que desarrolló López, et al. (2010), en el cual se realizó una identificación de los hongos benéficos que participan en el proceso de obtención de Queso Paipa en Lácteos Ibel, municipio de Belén

(Boyacá) en el cual se estudió la presencia de mohos y levaduras, durante el primero, quinto y décimo día de maduración, por lo cual se llevó a cabo un recuento e identificación de géneros de hongos y levaduras y se observó que el recuento total de hongos aumenta a medida que aumenta el tiempo de maduración.

Así mismo Sacristán (2015), Llevó a cabo una Selección de cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de quesos artesanales con vistas a la obtención de co-cultivos de interés tecnológico para la elaboración de quesos. En esta, se caracterizó a nivel tecnológico y genético cepas microbianas aisladas de un queso artesanal elaborado en el norte de España (el queso de Armada) para su aplicación como cultivo iniciador. Lográndose apreciar que el uso de este cultivo condicionó la evolución de los parámetros químicos y físico-químicos, especialmente del pH, la lactosa y la acidez titulable.

Además, en esta investigación es importante conocer fundamentos teóricos de gran utilidad en el Aislamiento del moho *Penicillium candidum*, como la taxonomía del hongo, perteneciendo este al género *Penicillium*, familia *Trichocomaceae*, orden *Eurotiales*, clase *Euascmycetes*, división *Ascomycota*, así mismo, es eucariótico, aeróbico, con un cuerpo vegetativo compuesto por hifas septadas, con una reproducción tanto asexual como sexual, ocurriendo la asexual por medio de producción de conidios y la sexual por ascosporas.

Cabe resaltar la importancia de conocer la curva de crecimiento de los hongos filamentosos, ya que estas presentan tres fases: la primera es una fase de no crecimiento evidente, seguida de una fase de crecimiento rápido y finalmente una fase sin crecimiento neto o de autólisis y disminución en peso seco.

Para llevar a cabo esta investigación fue necesaria plantear una metodología, de aislamiento, caracterización morfológica macroscópica y microscópica, del Moho *Penicillium candidum*, basada en la metodología propuesta por López, et al. (2010), que consistió en la siembra en medios específicos, como el Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF), ya que los mismos ofrecen al moho los nutrientes necesarios para su crecimiento. Además, se elaboraron laminocultivos para la identificación micromorfológica del moho y la conservación del moho aislado, consistió en un almacenamiento a corto plazo.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo I

Planteamiento del Problema

La leche es un alimento que, al ser consumido, beneficia a los seres humanos por ser un producto que proporciona vitaminas, proteínas y minerales importantes para llevar una vida sana. Así mismo, este alimento tiene derivados como la mantequilla, yogurt y queso; conocidos como productos lácteos. El queso, es un producto consumido mundialmente y existen diversos tipos como los frescos, pasta blanda, pasta firme y pasta dura. (Borregales, s.f).

El queso Brie, es un queso de pasta blanda, madurado que emplea en su elaboración el moho *Penicillium candidum*, el cual actúa durante la maduración del mismo y le otorga sus características organolépticas, como sabor, olor, textura y color. Dado que la Empresa Procesadora de Alimentos Universitaria (P.A.U), “Lácteos Santa Rosa A.C”, en la actualidad fabrican queso tipo Brie empleando un moho que es importado y costoso, por tanto, difícil de adquirir, surge la importancia de desarrollar un trabajo de investigación que nos permita aislar el moho *Penicillium candidum* a partir de un queso tipo Brie, elaborado por Lácteos Santa Rosa. Considerando los medios de cultivo, que le proporcionen los nutrientes necesarios para su crecimiento, además de condiciones adecuadas en incubación como humedad y temperatura recomendadas, para así obtener tanto la estructura vegetativa y reproductiva de este moho y conocer si al ser inoculado en la elaboración de queso brie, proporciona las mismas o mejores características organolépticas que presenta este tipo de queso hoy día, ofreciendo de este modo una alternativa económicamente viable a Lácteos Santa Rosa.

Objetivos

Objetivo General

Aislar el Moho *Penicillium candidum* de un Queso Tipo Brie, fabricado en la Productora de Alimentos Universitaria (P.A.U) “Lácteos Santa Rosa A.C”.

Objetivo Específicos

- Realizar el aislamiento del moho *Penicillium candidum* de un queso tipo Brie estándar, empleando los medios de cultivos Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF).
- Realizar la caracterización macromorfológica del moho aislado.
- Realizar la caracterización micromorfológica del moho.
- Conservar cepas del moho aislado, empleando un método de almacenamiento a corto plazo.

Justificación

La presencia de mohos en los quesos, como agentes secundarios en la maduración, intervienen, debido a la producción de un complejo sistema de enzimas como proteasas y lipasas los cuales contribuyen con la textura y sabor de cada tipo de queso. El crecimiento de mohos en la superficie proporciona una apariencia, color y sabor determinado.

El queso Brie, es un queso de pasta blanda que puede ser preparado a partir de leche cruda o pasteurizada; sin embargo, la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 2850-92, indica que la leche a emplear para la elaboración del Queso Brie, debe ser pasteurizada. Así mismo, este queso, está cubierto de una suave capa blanca completamente comestible, formada por el moho *Penicillium candidum*, utilizado para que actúe durante la maduración del queso, la cual ocurre desde el exterior al interior y le da su cremosidad característica.

Debido a que el Moho *Penicillium candidum* juega un papel muy importante en la maduración del Queso brie y, actualmente para la Empresa Lácteos Santa Rosa, es difícil de adquirir, dado que es un producto costoso, la alternativa de aislar el moho *Penicillium candidum* resulta viable puesto que, al llevar a cabo este proyecto, se podrá disponer del moho para su posterior utilización en la elaboración del Queso tipo Brie, generando en dichos quesos, características organolépticas que pueden ser iguales e incluso mejores a las que hoy día se tiene en dicha empresa.

Para identificar el moho aislado, es necesario realizar una caracterización macroscópica y microscópica del mismo, para analizar su estructura; evaluar si es apto para emplearlo en la elaboración del Queso tipo Brie, y si cumple su función durante la maduración, como lo hace el

moho comercial. Además, con esta propuesta, se estaría innovando y promoviendo la incorporación del *Penicillium candidum* aislado, en la producción de este exquisito queso; que puede representar a largo plazo una reducción de gastos en la fabricación del Queso tipo Brie.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo II

Marco Teórico

Antecedentes de la Investigación.

(López, et al. 2010), en su investigación titulada “Identificación de Hongos Benéficos que participan en el proceso de obtención del Queso Paipa en Lácteos Ibel, municipio de Belén (Boyacá)”, estudió la presencia de mohos y levaduras durante la maduración, por lo cual se llevó a cabo un recuento e identificación de géneros de hongos y levaduras. Para esto, se tomaron 9 muestras de queso Paipa, de uno, cinco y diez días de maduración, así como una muestra de leche empleada como materia prima. Emplearon para diluir las muestras de queso, agua peptonada al 0,1% y como medio de cultivo para mohos, el agar extracto de malta y para levaduras el agar extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol (YGC); posterior al tiempo de incubación de 7 días, se llevaron a cabo subcultivos de los hongos aislados, en esta ocasión en extracto de malta, Agar Papa Dextrosa (PDA) Y Agar arroz al 20% para los mohos y para las levaduras, al igual que en el primer cultivo el agar YGC, empleando condiciones de temperatura y tiempo de incubación de 25°C y 7 días respectivamente. Este proceso se replicó hasta la obtención de cultivos puros. Posteriormente, se realizó una observación macroscópica de las colonias considerando color anverso y reverso, textura y presencia de pigmento difusible y una identificación microscópica empleando un montaje sobre un portaobjetos con azul de lactofenol, para identificar en los mohos estructuras vegetativas y reproductivas y se encontró los géneros de mohos *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Phoma*. Por otra parte, se realizó una

identificación macroscópica de las levaduras tomando en cuenta características propias de las colonias como la apariencia, textura, color, borde, tamaño, producción de pigmento y una identificación microscópica inicial empleando coloración tinta china, para observar posible presencia de capsula, en este caso se encontraron los géneros de levaduras *Cryptococcus*, *Candida* y *Rodothorula*. Revelando que existe un aumento en el recuento de mohos a medida que aumenta el tiempo de maduración y que los mohos encontrados como el *Geotrichum*, *Penicillium* y *Mucor*, al encontrarse en un número adecuado, son beneficiosos durante la maduración del queso Paipa, ya que poseen un sistema de enzimas que aportan sabor, color y textura al mismo. Por otra parte, las levaduras encontradas son favorecedoras durante los primeros días, ya que, metabolizan el lactato y ayudan en la desacidificación. Además, estos organismos muestran una capacidad metabólica que incluye actividades proteolíticas y lipolíticas, las cuales juegan un papel substancial en el desarrollo de aromas, sabores y algunas cepas producen sustancias inhibitorias contra varios microorganismos patógenos e indeseables.

(Sacristán, 2015), llevó a cabo una “Selección de cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de quesos artesanales con vistas a la obtención de co-cultivos de interés tecnológico para la elaboración de quesos”, en esta se pretende caracterizar a nivel tecnológico y genético cepas microbianas aisladas de un queso artesanal elaborado en el norte de España (el queso de Armada) para su aplicación como cultivo iniciador. A través del empleo de este tipo de cultivos iniciadores formulados a partir de cepas autóctonas, se pretende reproducir fielmente las características sensoriales del queso artesanal elaborado con leche cruda cuando éste es elaborado con leche pasteurizada. Esto permitiría producir a nivel industrial quesos con características originales y únicas, a la vez garantizar una calidad higiénico-sanitaria y una homogeneidad de los lotes. El

queso de Armada (variedad Sobado) es un queso de elaboración artesanal extragraso, semicurado o curado, elaborado con leche cruda y entera de vaca y cabra o únicamente de cabra, con forma troncopiramidal, de pasta compacta y esporádicamente con la corteza y el interior enmohecidos. *Geotrichum candidum* constituyó la especie dominante entre la microbiota fúngica en el queso de Armada, focalizando entonces el interés y objetivos de un trabajo de investigación. Este microorganismo posee diversas rutas metabólicas de interés en la industria láctea, y más en concreto en la maduración de numerosos quesos blandos y semiduros, al participar activamente en los procesos bioquímicos de proteólisis y lipólisis. Por otro lado, proporciona al queso una apariencia uniforme, blanca y aterciopelada, y determina en buena parte la textura, cohesividad y espesor de la corteza, así como el desarrollo del flavor. Para la realización de este proyecto, se partió de un total de 41 cepas de *Geotrichum candidum* aisladas del queso de Armada, variedad Sobado, a las cuales se les realizó un estudio de la aptitud tecnológica, evaluando sus actividades enzimáticas, incluidas las actividades proteolíticas, lipolíticas y la actividad aminopeptidasa. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron 4 cepas de *G. candidum* como co-cultivos iniciadores con el objetivo de estudiar su papel en la maduración de un queso de cabra semicurado. Posteriormente, se estudió el efecto de *G. candidum*, sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales a lo largo de la maduración del queso. Apreciándose, que el uso de este cultivo iniciador condicionó la evolución de los parámetros químicos y físico-químicos, especialmente del pH, la lactosa y la acidez titulable. Además, en cuanto a las características sensoriales se refiere, los quesos elaborados con las cepas de *G. candidum* desarrollaron un deseable aroma a cabra y una textura más cremosa. Concluyendo, que la cepa más adecuada para ser usada como co-cultivo en este tipo de queso fue la que contaba con alta actividad lipolítica y baja actividad proteolítica

(Arias y Piñeros, 2008), realizaron un “Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde, específicamente en la zona de frailejones”. Para llevar a cabo el aislamiento se emplearon tres técnicas: Dilución en Placa, Siembra Directa en Suelo y Lavado de Suelo, mientras que para la identificación del género y posible especie fue necesario la utilización de claves taxonómicas, teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas. Mediante esta investigación se encontró una población fúngica que pertenece a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Emericella*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Microsporum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sterigmatocystis* y *Trichoderma*; siendo los géneros de mayor incidencia *Aspergillus* y *Penicillium*.

(Godínez y Calderón, 2008), llevaron a cabo una investigación enfocada, en la “Influencia del tiempo de conservación por liofilización en cepas del género *penicillium* de utilidad en la industria alimenticia”. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las características de cepas de la especie *Penicillium camemberti* preservadas por liofilización durante un período de tiempo mayor de 10 años. En esta se realizó la evaluación de 10 cepas de hongos filamentosos pertenecientes a la especie *Penicillium camemberti* de utilidad en la elaboración de quesos Camembert y conservadas por liofilización a una temperatura de 6 ± 1 °C durante un periodo de tiempo de 10 a 20 años en un banco de cepas. El estudio comprendió la determinación del porcentaje de retención de viabilidad, crecimiento en medio sólido, características macromorfológicas, características micromorfológicas, capacidad proteolítica y lipolítica. Los resultados mostraron que el empleo de este método aseguró una supervivencia de 100 % de las cepas, sin detectarse alteraciones en sus características macromorfológicas y micromorfológicas, ya que, macroscópicamente, todas las colonias de las diferentes cepas mostraron un color blanco que se mantiene sin cambios con el

tiempo, una textura lanosa con un micelio en apariencia grueso y colonias ligeramente convexas, mientras que microscópicamente, se observaron conidios de color blanco, lisos, esféricos y penicilios asimétricos de paredes rugosas. Los cultivos mantuvieron sus características de crecimiento de colonias en medio sólido entre 25 y 40mm. Con respecto a la actividad enzimática (Proteolítica y Lipolítica), en todos los casos se detectó el halo de hidrólisis alrededor de la colonia como resultado de la actividad proteolítica y en cuanto a la actividad lipolítica, el comportamiento de las cepas fue similar al presentado por cultivos empleados en la producción de quesos. Los resultados obtenidos confirman la validez del empleo de la liofilización como método de preservación de especies fúngicas de utilidad industrial.

Por otro lado, se requieren de bases teóricas para lograr los objetivos planteados en esta investigación, ya que, se debe tener conocimiento de las condiciones de incubación recomendadas para el crecimiento del *Penicillium candidum* como nutrientes, humedad, temperatura y pH; de la taxonomía del moho para identificarlo, el tipo de reproducción que realiza entre otros. A continuación, se presentan los fundamentos teóricos más importantes para esta investigación:

Reinos de la Naturaleza

Los reinos de la naturaleza son la forma en que se clasifican los seres vivos según sus características. La ciencia actual define cuatro reinos de seres vivos: Reino Animalia, Reino Plantae, Reino Fungí y Reino Protista.

Los criterios para decidir la manera en la que se agrupan los seres vivos a cada reino responden a ciertas características comunes entre las especies, tales como:

- Organización celular: unicelular o pluricelular
- Célula: eucariota o procariota
- Reproducción: sexual, asexual o por esporas
- Nutrición: heterótrofa o autótrofa
- Locomoción: autónoma o inmóvil
- Respiración: Aeróbica o Anaeróbica

Reino Animalia o Animal. Está compuesto por organismos pluricelulares, eucariotas, heterótrofos, aeróbicos que se reproducen sexualmente y se mueven de forma autónoma. Se clasifica en dos grandes grupos: los vertebrados, que se subdividen en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos y los invertebrados, que incluyen insectos, moluscos y gusanos.

Reino Plantae. Está compuesto por organismos pluricelulares, eucariotas, autótrofos, anaeróbicos, inmóviles, que se reproducen sexual o asexualmente. Básicamente se trata de todas las especies vegetales, con o sin flores. Las plantas son los únicos seres (a excepción de algunas algas unicelulares del reino protista) que son autótrofos gracias a la generación de su propio alimento a través de la fotosíntesis.

Reino Fungí o Reino de los Hongos. Pertenecen a este reino los organismos unicelulares, pluricelulares, eucariotas, heterótrofos, aeróbicos e inmóviles que se reproducen a través de esporas sexual o asexualmente.

Reino Protista. Está constituido por todos los organismos que no se clasifican en ninguno de los otros reinos identificados, Pueden ser organismos tanto unicelulares como pluricelulares, aeróbicos o anaeróbicos, autótrofos o heterótrofos, de reproducción sexual o asexual. Se define

como el reino de las primeras formas eucariotas de vida y pertenecen a ella los protozoarios y algas (*Reinos de la Naturaleza*, 2020).

Hongos

Los hongos son organismos vivos eucariotas que se clasifican dentro del reino Fungí, incluyéndose las levaduras, mohos y setas. De manera general, los hongos, anteriormente se clasificaban dentro de las plantas, sin embargo, presentan características y particularidades propias que permitieron agruparlos dentro de un reino específico, el Fungí, diferente al de las plantas. Las características principales para separarlos de las plantas es que los hongos son heterótrofos y sus paredes celulares no están construidas a partir de celulosa, dichas paredes se componen de un biopolímero llamado quitina

En los organismos multicelulares que se encuentran agrupados en el reino Fungí, se tiene por lo general un desarrollo vegetativo enmarcado por la formación de un micelio, compuesto por hifas. Las hifas, son estructuras alargadas que tienden a estar compuestas por varias células, cada célula, contiene componentes celulares importantes para el funcionamiento articulado de toda la hifa. En relación a esto, existe también un desarrollo reproductivo que puede ser sexual o asexual, en dicho desarrollo, el hongo dependiendo de las características ambientales, esporula para dispersarse y colonizar ambientes cercanos o para mantenerse latente, pero viable durante condiciones adversas.

En el desarrollo reproductivo, las setas, macromicetos o “verdaderos hongos”, forman un cuerpo fructífero que es lo que normalmente vemos y conocemos como hongos, algunos de estos son comestibles y otros tóxicos.

Las levaduras y los mohos no presentan las características macroscópicas de las setas, sin embargo, cumplen funciones similares en cuanto a la degradación de compuestos; así mismo, las levaduras son organismos unicelulares que tienen generalmente reproducción asexual y cuentan con un gran potencial biotecnológico, investigado principalmente en la industria alimentaria donde se usan en procesos fermentativos; los mohos, son multicelulares y son organismos que descomponen gran cantidad de alimentos, pero son utilizados biotecnológicamente para producir fármacos y en cadenas de producción alimenticia (Grisales, 2017).

Hongos Filamentosos o Mohos. Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente. Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por tanto, no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse a partir de materia orgánica ya elaborada. Así mismo, tienen una pared celular formada por quitina el cual es un compuesto (polisacárido) fuertemente rígido. Por lo anterior, este tipo de microorganismos deben absorber los nutrientes simples y solubles, al contrario de fagocitar los alimentos.

La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo o micelio, que a su vez está constituido por múltiples filamentos o hifas (hyphomycetos o mohos), la mayor parte de estos hongos son inmóviles, no obstante, algunos pueden tener células reproductoras móviles. Las esporas son cuerpos resistentes que forman los hongos en estado latente o de reposo, que se producen de dos maneras diferentes, sexual y asexualmente.

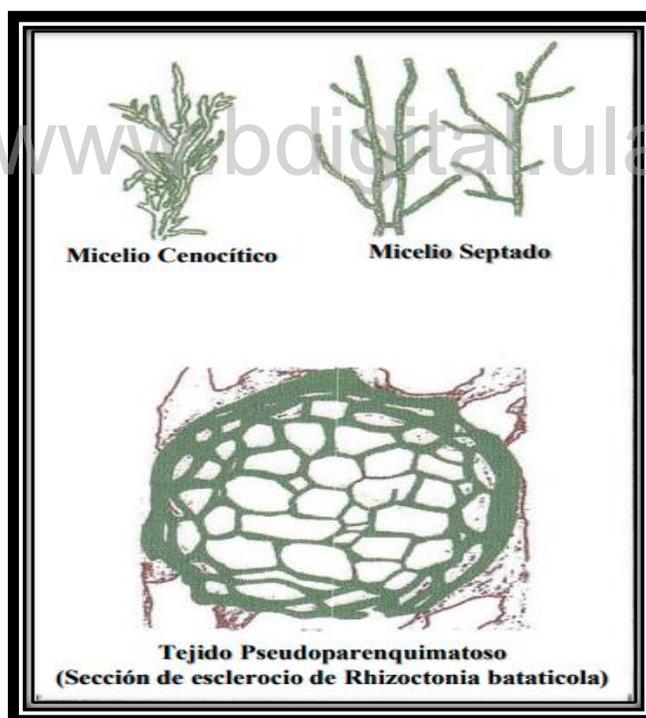
Fisiológicamente, los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones de azúcares elevado, hasta el 10%, debido a que estos microorganismos no son sensibles a la presión osmótica elevada; creciendo muy lentamente de 5 a 7 días, y resistiendo condiciones de acidez relativamente altas (pH entre 2-9, óptimo pH: 5-6). La glucosa es una fuente de carbono aprovechada por muchos hongos, también pueden utilizar compuestos de carbono orgánico complejos como el almidón y la celulosa. De igual forma aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico como sales de amonio y nitratos y emplean además sustratos con nitrógeno inorgánico y carbono, como por ejemplo el extracto de levadura y peptona (Arias y Piñeros, 2008).

El Micelio. El cuerpo vegetativo de un hongo consiste de una red de filamentos profusamente ramificados conocidos como hifas, y una masa de hifa es llamada micelio. Las hifas crecen por elongación terminal y apical. Estas están segmentadas en células por paredes transversales, las cuales son llamadas septa, y el micelio segmentado es conocido como septado. El septo es como una pared transversal, perpendicular al eje de la hifa y se origina de un pequeño anillo interno de la pared celular el cual crece hasta formar una especie de disco con unos poros que permiten el intercambio de protoplasma de células contiguas, incluyendo organelas, mitocondrias y núcleo. Los septos que delimitan las estructuras reproductivas no poseen poros. Si la hifa no es segmentada se dice que es cenocítica; sin embargo, septas pueden ser formadas durante el desarrollo de cuerpos reproductivos, o cuando el micelio es dañado, o cuando hay nutrición insuficiente. En otras clases de hongo el micelio siempre es septado. En algunos hongos, como las levaduras, el desarrollo del micelio es limitado, y en el género *Synchytrium* el micelio está completamente ausente.

Las hifas raramente se encuentran solitarias. Hifas vecinas generalmente se entrelazan formando masas semejando a fieltro, y se forman tejidos hifales gruesos, como en los cuerpos fructíferos de los hongos superiores. Esos tejidos tienen semejanza al parénquima de las plantas superiores, pero como son el resultado del entrelazamiento y unión de hifas, son denominados tejidos pseudoparenquimatosos, como se observa en la Figura 1.

Figura 1.

Micelio Cenocítico. Micelio Septado. Tejido Pseudoparenquimatoso.



Nota. Adaptado de *Tejido Pseudoparenquimatoso*, Subero, s.f, <https://es.scribd.com/document/51499039/6-Los-hongos-morfologia-reproduccion>.

Las hifas algunas veces se funden; en tales casos la pared celular desaparece en el punto de contacto y las dos células se abren una dentro de la otra. Dos células adyacentes en una hifa algunas veces se unen por medio de un tubo de conexión, formando alrededor del septo divisor; este tubo se encorva hasta que su punta alcanza la célula inferior, con la cual se funde; una abertura es luego formada alrededor del septo. Tales conexiones son conocidas como grapas de conexión. Estas usualmente se forman en la parte apical de la hifa.

Las células de los hongos contienen citoplasma, núcleo y vacuolas. Ellas son uninucleadas, pero en el micelio cenocítico son multinucleadas. Los hongos almacenan sus reservas alimenticias en forma de gotas de aceite y glicógeno el cual es un carbohidrato.

El micelio de los hongos, en relación con sus funciones muestra varias agregaciones o transformaciones, siendo algunas de ellas:

Agrupamientos de hifas para formar cordones o cojines más o menos compactos. En los cuales las hifas pueden mantener su individualidad formando tejidos prosenquimáticos, o formar tejidos plectenquimáticos cuando la fusión es completa y no se pueden distinguir las hifas individualizadas. Ejemplos de estas estructuras vegetativas son las rizomorfas y los esclerocios, que cumplen unci3n de perpetuaci3n y propagaci3n.

Las hifas sufren transformaciones especiales como son los apresorios y los haustorios. **El apresorio** es un 3rgano de presi3n achatado que se forma en la parte terminal de una hifa, del cual se forma un diminuto clavo de infecci3n que crece y penetra la c3lula epid3rmica del hospedero. **El haustorio** es una proyecci3n de la hifa en el interior de la c3lula del hospedante, funcionando como elemento de alimentaci3n. Su forma es variada (redondeada, digitiforme, ramificada, etc.). Esta estructura proporciona al pat3geno mayor superficie de contacto con el

protoplasma de la célula del hospedante y aumento de la capacidad de absorción. Otra transformación de las hifas del micelio son las clamidosporas, las cuales son células redondeadas con paredes gruesas que se forman en la célula apical o en las células intermedias de las hifas. Por el espesor de la pared celular la clamidospora cumple funciones de perpetuación.

Reproducción. Es la formación de nuevos individuos con características típicas de la especie. Dos tipos de reproducción son reconocidas: sexual y asexual. La reproducción asexual, algunas veces llamada somática o vegetativa, no lleva consigo la unión de núcleos, células sexuales u órganos sexuales. La reproducción sexual, por otro lado, está caracterizada por la unión de dos núcleos.

Reproducción asexual. Típicamente, los hongos se reproducen tanto asexual como sexualmente. En general la reproducción asexual es más importante para la propagación de las especies porque ésta termina en la producción de numerosos individuos. Una definición más amplia, incluye algunos métodos de propagación de nuevos individuos, tal como la simple división de un organismo unicelular en células hijas, o de un talo multicelular en un número de fragmentos cada uno de los cuales da lugar a un nuevo individuo. De acuerdo con este concepto los métodos de reproducción asexual comúnmente encontrados en los hongos pueden ser resumido como sigue: 1) fragmentación del soma dando lugar cada fragmento a un nuevo individuo, 2) fusión de las células somáticas en células hijas, 3) gemación de las células somáticas o esporas, cada brote produce un nuevo individuo y 4) producción de esporas, cada una de éstas usualmente germina para formar un tubo germinativo que crece y da lugar al micelio.

Algunos hongos emplean la fragmentación de hifas como un medio normal de propagación. La hifa puede romperse en sus células componentes, las cuales se comportan como esporas. Esas esporas son conocidas como artrosporas. La fragmentación puede ocurrir también accidentalmente

por el desmembramiento de partes del micelio por fuerzas externas. Tales pedazos de micelio bajo condiciones favorables darán lugar a un nuevo individuo.

La fusión es la simple escisión de una célula en dos células hijas por constricción y la formación de una pared celular, es característico de un número de organismos simples incluyendo algunas levaduras, las cuales son verdaderos hongos.

El método más común de reproducción asexual en los hongos es por medio de esporas. Estas varían en color desde hialinas hasta verdes, amarillas, anaranjadas, rojas, marrones y negras; en tamaño, desde diminutas hasta grandes; en forma, desde globosas hasta oval, oblonga, en forma de aguja y helicoidal; en número de células de una a muchas. Algunos hongos forman solamente un tipo de esporas, mientras que otros producen hasta cuatro tipos. Las esporas fungosas producidas asexualmente nacen en esporangios y son llamados esporangiosporas, o son producidos en la punta o al lado de hifas en varias formas y son llamados conidios.

Los conidios, algunas veces llamados conidiosporas se forman en los hongos imperfectos (*Deuteromycetes*) para los cuales representan la única forma de reproducción. También se encuentran en la fase asexual de los *Ascomycetes*. La hifa que lleva el conidio se llama conidióforo, y la célula que lo produce se denomina conidiógena. El conidio puede originarse directamente de un segmento del talo (desarrollo tálico), pero más comúnmente este desarrollo es blástico, o sea que se deriva de un engrosamiento de la célula conidiógena.

Los conidios pueden ser acrógenos cuando nacen en la extremidad del conidióforo; pleurógenos cuando nacen de los lados, o acropleurógenos cuando nacen tanto del ápice como de los lados del conidióforo.

El esporangio, es una estructura en forma de saco cuyo contenido es convertido a través de clivaje en muchas esporas. Las esporangiosporas pueden ser mátiles o mótilas. En los hongos más simples las esporangiosporas de los hongos son usualmente mátilas y se denominan zoosporas. Si son mótilas son llamadas aplanosporas. Las zoosporas están provistas de uno o dos flagelos. Hay al menos dos tipos de flagelos en los hongos: uno en forma de látigo (Whiplash) y otro en forma de cepillo (Pincel).

Reproducción sexual. La reproducción sexual en los hongos así como en otros organismos vivos envuelve la unión de dos núcleos compatibles. El proceso de esta reproducción consiste típicamente de tres fases distintas. En la primera de ellas, llamada plasmogamia, la unión de dos núcleos de protoplastos se junta en una misma célula. La fusión de los dos núcleos juntados por la plasmogamia es llamado cariogamia y constituye la segunda fase de la reproducción sexual. La cariogamia sigue a la plasmogamia casi inmediatamente en muchos de los hongos más simples. En los hongos más complejos, sin embargo, esos dos procesos están separados en el tiempo y el espacio, resultando la plasmogamia una célula binucleada con un núcleo de cada padre. Este par de núcleos es denominado dicarion. La fusión nuclear, la cual tiene lugar eventualmente en todos los hongos con reproducción sexual es más pronto o más tarde seguida por la meiosis la cual nuevamente reduce el número de cromosomas al estado haploide, y constituye la tercera fase de la reproducción sexual. Resumiendo: la plasmogamia junta a dos núcleos haploides en una célula; la cariogamia une a estos dos núcleos en un núcleo cigote diploide; y la meiosis restaura la condición haploide en los cuatro núcleos que resultan de ella. En un verdadero ciclo sexual estos tres procesos ocurren en una secuencia regular y usualmente en puntos específicos.

Algunas especies producen órganos sexuales masculinos y femeninos sobre cada talo. Esas especies son hermafroditas o monoicas. Un simple talo de una especie hermafrodita puede reproducirse sexualmente por sí mismo si es autocompatible. Otras especies consisten de un talo masculino y otro femenino, donde cada sexo está en un talo distinto. Estas especies se denominan dioicas. Un talo simple de una especie dioica no se puede reproducir sexualmente por sí mismo ya que es o masculino o femenino.

Los órganos sexuales de los hongos son llamados gametangios, los cuales pueden formar células sexuales diferenciadas llamadas gametos o pueden contener, en cambio, uno o más núcleos gaméticos. Los gametangios y gametos que son morfológicamente indistinguibles son denominados isogametangios e isogametos, respectivamente, heterogametangio y heterogametos a los gametangios y gametos que son morfológicamente diferentes. En el último caso, el gametangio masculino es llamado anteridio y el femenino oogonio.

Se conocen varios métodos por el cual núcleos compatibles son juntados en el proceso de plasmogamia de la reproducción sexual. Estos métodos son:

- **Copulación planogamética**
 - a. **Conjugación de planogametos isógamos.** Los dos gametos nadadores que son morfológicamente iguales, pero fisiológicamente diferentes, se unen en el agua para formar un cigote móvil. Este proceso se produce en *Olpidium viciae* y *Synchitrium endobioticum*.
 - b. **Conjugación de planogametos anisógamos.** Un planogameto es considerablemente más grande que el otro. La fusión tiene lugar en el agua, y es

formado el cigote móvil. Este tipo de reproducción es producido solamente en algunas especies en el orden Blastocidiales de los Chitridiomycetes.

- **Copulación gametangial:** Es un método de reproducción en el cual dos gametangios o sus protoplastos se funden para dar lugar a un cigote que se desarrolla en una espóra de resistencia.
- **Contacto gametangial:** Es un método de reproducción sexual en el cual dos gametangios se ponen en contacto pero no se funden; los núcleos masculinos migran a través de un poro o tubo de fertilización dentro del gametangio femenino. Este proceso se produce en la reproducción sexual de *Pyronema omphalodes*, un Ascomycete.
- **Espermatización:** Es una plasmogamia por la unión de un espermacio con una estructura receptiva.
- **Somatogamia:** Es la fusión de células somáticas durante la plasmogamia (Subero, s.f).

Condiciones de Crecimiento. La temperatura influye en el crecimiento, la germinación de esporas, reproducción y en general todas las actividades del organismo. Los hongos se pueden clasificar como psicrófilicos, mesófilicos o termófilicos. Los psicrófilicos tienen un mínimo de temperatura de crecimiento menor a los 0°C y máxima menor a los 20°C siendo la óptima en un rango de 0 - 17°C. Los mesófilos, la mayoría de los hongos, tienen una temperatura mínima de 0°C, máxima menor a 50°C y óptima entre 15 y 40°C; y los termófilos, una mínima mayor a los

20°C, máxima mayor a los 50°C y optima entre 35 y 50°C. La mayoría de los hongos crece a un rango de temperatura entre 25 a 30°C.

El pH es fundamental para el desarrollo de los hongos, a un pH alto se ve afectada la solubilidad de los metales y a pH bajo se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales y ácidos orgánicos y la toma de minerales. El pH óptimo se encuentra entre 4 y 6.

Curva de Crecimiento de Hongos Filamentosos. Las curvas de crecimiento presentan tres fases: la primera es una fase de no crecimiento evidente, seguida de una fase de crecimiento rápido y finalmente una fase sin crecimiento neto o de autólisis y disminución en peso seco.

No todos los hongos cumplen este esquema, se observan curvas de dos fases, en la que el crecimiento inicial es seguido de una segunda fase en la que se detiene el crecimiento. Esta segunda fase puede representar una fase de síntesis de polisacáridos, sin un aumento en otros componentes celulares, o puede depender de una movilización de nitrógeno de hifas más viejas y su uso para crecimiento neto, este es reutilizado después de agotar fuentes exógenas de nitrógeno disponibles.

La primera fase, sin crecimiento aparente, tiene dos componentes: una fase anterior a la germinación de esporas y una fase en que el crecimiento se presenta, pero no se evidencia. En la segunda fase ocurre un rápido crecimiento y un desarrollo del micelio cuyo crecimiento ocurre en las extremidades de las hifas. Las células al interior del micelio no contribuyen al crecimiento neto, aportan nutrientes a células periféricas, especialmente a estructuras aéreas. En esta fase ocurre la utilización de carbohidratos, nitrógenos y fosfatos; además pueden aparecer las esporas al final de esta fase o antes de su finalización.

La tercera fase se caracteriza por una disminución en el peso del micelio y la aparición de nitrógeno y fosfato en el medio. Un patrón común es la pérdida de peso por un corto periodo de tiempo sin ningún cambio después de esto. Puede presentarse, también, autólisis del micelio por el rompimiento de quitina, carbohidratos y proteínas, catalizado por las enzimas del hongo. Entre otros productos de la lisis se encuentran el amoníaco, aminoácidos, compuestos de fosforo orgánico y compuestos de azufre. La disminución del crecimiento se debe a dos factores principales: la acumulación de metabolitos tóxicos, ácidos orgánicos en medios con gran cantidad de carbohidratos y de amoníaco en medios con alto contenido de nitrógeno, y el agotamiento de la fuente de carbono. Así mismo, en esta fase las células realizan un metabolismo secundario, específicamente rutas metabólicas que no son esenciales para las células pero que están involucradas en la supervivencia del organismo (Arias y Piñeros, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Procesos Metabólicos en Los Hongos. Los factores del ambiente ejercen profunda influencia sobre el crecimiento y la reproducción de los hongos, tal como lo hace con otros entes vivientes. Tales factores no sólo influyen sobre la tasa de crecimiento, sino que también pueden propiciar diferencias en los tipos de crecimiento. El término general metabolismo es utilizado para todos los procesos concernientes a las actividades vitales de las plantas. Entre los principales factores ambientales que ejercen influencia sobre el metabolismo están la nutrición, la humedad, la temperatura, la luz y la acidez y alcalinidad del sustrato.

Nutrición. Una adecuada suplencia de nutrimentos es esencial para el crecimiento y multiplicación de los hongos. Debido a la presencia de pared celular en las células fungosas, ellas absorben nutrimentos en solución. Parásitos y otros hongos que crecen sobre sustratos sólidos tienen que convertir nutrimentos a forma soluble antes que puedan ser absorbidos, y esto lo hacen

los hongos a través de la acción de enzimas que ellos pueden producir. Las enzimas son productos de secreción de células bacterianas y fungosas y pueden ser intracelular (endoenzimas) o extracelular (exoenzimas).

Los hongos necesitan hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y cantidades más pequeñas de potasio, fósforo y azufre. A diferencia de las plantas verdes, las cuales pueden utilizar carbono inorgánico como dióxido de carbono, los hongos son incapaces de crecer a menos que el carbono sea previsto en forma orgánica. Trazas de otros elementos, como magnesio y hierro, son también necesarios para el metabolismo de los hongos. Ellos no necesitan calcio, el cual es esencial para el crecimiento de las plantas superiores.

Los hongos respiran como todas las otras plantas, oxígeno atmosférico reemplazando al dióxido de carbono en el proceso. Algunos microorganismos requieren libre acceso al oxígeno para un adecuado crecimiento, denominándose aeróbicos. Otros dejan de crecer en presencia de oxígeno libre, y tiene que ser proporcionado en forma combinada. Tales organismos son conocidos como anaeróbicos. La germinación de las esporas de varios hongos depende de la presencia de oxígeno libre. Si el oxígeno libre no está presente en abundancia, las esporas dejan de germinar.

Humedad. Algunas esporas, especialmente las de resistencia, han sido dotadas de mecanismos para resistir la desecación por largos períodos de tiempo. Pero para su germinación es necesaria una alta humedad relativa. Muchos hongos crecen bien si se sumergen en agua y algunos son normalmente encontrados sumergidos en ella. Esos son los hongos acuáticos y pertenecen, como regla, a los Hipochytridiomycetes. Una mayoría de las especies de hongos crecen y se reproducen bien solamente en sustratos sólidos, pero necesitan alta humedad. Las esporas de muchos hongos dejan de germinar si éstos son sumergidos en agua, principalmente

debido a que necesitan de oxígeno. Si ellos flotan en la superficie germinan en gran número. En la mayoría de los casos la mejor germinación tiene lugar cuando la humedad está por encima de 90%.

Temperatura. Los hongos reaccionan a la temperatura de la misma manera que las plantas verdes. Hay un mínimo debajo del cual un hongo cesa de crecer, un óptimo donde tiene lugar al mejor crecimiento, y también un máximo sobre el cual no puede crecer. Aun cuando los hongos no pueden crecer por encima del máximo o por debajo del mínimo, ellos pueden resistir exposiciones a más altas o más bajas temperaturas sin que sea determinada su viabilidad. Por cierto que, las esporas de algunos hongos tienen que ser congeladas como tratamiento preliminar antes de que puedan germinar.

El óptimo de temperatura para el crecimiento del micelio de un hongo no necesariamente necesita coincidir con la óptima para la producción abundante de esporas o para la mejor germinación de éstas. La óptima para esos últimos procesos puede ser, y usualmente es, diferente de aquellas para el mejor crecimiento del micelio.

Luz. No es posible hacer generalizaciones en lo concerniente a la influencia de la luz sobre el crecimiento de los hongos. Algunos crecen bien en luz, y otros en la oscuridad. Los esclerocios de *Sclerotium sclerotiorum* colocados en aserrín húmedo a baja temperatura en un cuarto oscuro forma solamente los inicios de los apotecios. Estos se desarrollan completamente tan pronto como son expuestos a luz brillante.

La luz ejerce mucha influencia sobre la germinación de las esporas de ciertos hongos. La luz ultravioleta, la luz directa del sol y luz intensa pero difusa inhiben la germinación de las teliosporas de *Puccinia graminis*. Por otro lado, se ha demostrado que la radiación ultravioleta ejerce una influencia considerable sobre el desarrollo de los cuerpos fructíferos de algunos hongos.

Se ha obtenido el estado perfecto de *Colletotrichum lagenarium*, el cual causa la antracnosis de las cucurbitáceas, por la exposición de cultivos en vigoroso crecimiento en cajas de Petri a rayos de luz ultravioleta. El efecto del estímulo en estos casos puede ser sobre el protoplasma, o puede ser sobre el núcleo, y es probablemente debido a la producción o destrucción de algunas sustancias intracelulares que afectan la actividad celular. Puede ser también una expresión de la ley que un micelio bien nutrido repentinamente inhibido en su crecimiento, cambia a micelio de reproducción. La exposición prolongada a los rayos ultravioleta es, sin embargo, dañino a los hongos porque tienen propiedades fungicida.

Reacción a estímulos. Los hongos toleran una amplia variación de concentración de iones hidrógenos e hidróxidos. Se ha observado que un medio ligeramente ácido es favorable para el buen crecimiento de varios hongos. *Sclerotinia americana* muestra una marcada tolerancia a la acidez. Un buen crecimiento de este hongo tiene lugar entre pH 1.4 y 5.8, y el óptimo está cerca de pH 2.5. El apotecio se forma en el suelo solamente con una reacción ácida. Su desarrollo es inhibido si el pH del suelo es 6.8 o más.

Los hongos responden a estímulos físicos y químicos. Ellos crecen en respuesta a la humedad (hidropismo), oxígeno (aerotropismo) o químicos (quimitropismo). Tales respuestas pueden ser positivas o negativas, y diferentes a diferentes períodos de crecimiento. Hay tres períodos de crecimiento en la vida de un hongo. Ellos son: 1) la fase vegetativa, 2) la fase de reproducción asexual y 3) la fase cuando son formados los órganos sexuales. Estas fases están interrelacionadas, pero las óptimas condiciones para una fase no es la misma para otra (Subero, s.f).

Requerimientos Nutricionales de Hongos Filamentosos. Una de las características principales de los hongos es su inhabilidad de utilizar el carbono inorgánico. El compuesto más simple como fuente de energía es la glucosa, también utilizan fructosa, manosa y galactosa. Algunos hongos (*Basidiomycetes*) degradan la lignina a dióxido de carbono pero en presencia de otra fuente de carbono como celulosa, celobiosa o glucosa. Requieren, también, una fuente de nitrógeno, pueden utilizar nitrato y amonio. Los aminoácidos, la urea, algunos polipéptidos y proteínas son utilizados por algunos hongos pero no por todos. Una buena fuente de nitrógeno para muchos hongos es la caseína hidrolizada, una mezcla de aminoácidos.

Se puede incorporar sulfato al medio para los requerimientos de azufre, algunos *Chytridiomycetes* utilizan aminoácidos que tenga azufre como la metionina. Las vitaminas se requieren en mínimas cantidades, algunos hongos pueden sintetizar sus propias vitaminas, pero muchos necesitan tiamina, biotina, riboflavina, piridoxina y ácido nicotínico entre otras. Entre los macronutrientes se encuentra el potasio para el metabolismo de carbohidratos, actividad enzimática y para mantener el balance iónico; fósforo, como componente esencial de ácidos nucleicos y de mecanismos para la transferencia de energía; magnesio, activador de enzimas requeridas en el metabolismo del ATP; azufre, para algunos aminoácidos y vitaminas y calcio que actúa como activador de algunas enzimas. Necesitan micronutrientes como el hierro, cobre, manganeso, zinc y molibdeno.

Clasificación de Los Hongos. El reino de los hongos se encuentra dividido en los phylum *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* y hongos *mitospóricos*.

Phylum Chytridiomycota. Poseen células flageladas en su ciclo de vida (zoosporas) y se clasifican según la ultraestructura de las zoosporas. Poseen micelio cenocítico, talo holo o eucárpico como se observa en la figura 2. Reproducción sexual o asexual gracias al esporangio. Sus paredes celulares se componen principalmente de quitina y glucano.

Figura 2.

Synchytrium endobioticum, perteneciente al Phylum Chytridiomycota.

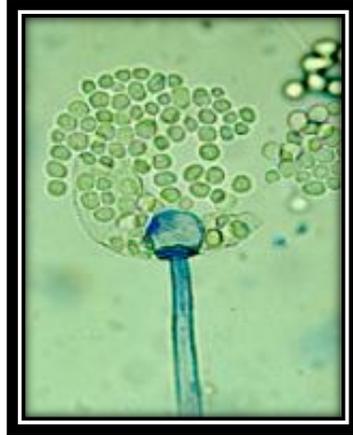


Nota. Adaptado de *Synchytrium endobioticum*, perteneciente al Phylum Chytridiomycota, Arias y Piñeros, 2008, <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Phylum Zygomycota. Su micelio es cenocítico, producen esporas sexuales denominadas zigosporas que se desarrollan en el zigosporangio como se observa en la figura 3. Algunos como *Rhizopus sp.* tienen órganos de fijación denominada rizoides. Su pared celular está compuesta de quitina, quitosano y ácido poligalacturónico.

Figura 3.

Mucor sp perteneciente al *Phylum Zygomycota*

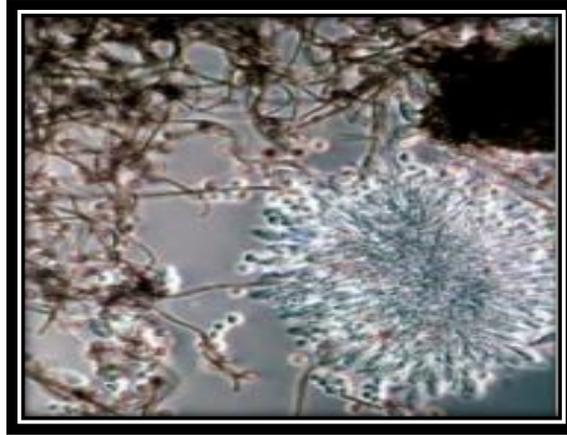


Nota. Adaptado de *Mucor sp* perteneciente al *Phylum Zygomycota*, Arias y Piñeros, 2008, <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Phylum Ascomycota. Sus hifas son septadas con un poro, a ambos lados del cual pueden observarse sendos “cuerpos de Woronin”, poseen ascosporas dentro de ascas, esta asca proviene de un ascogonio y en general está dispuesta en una capa de células similares y en estructuras características denominadas cleistotecio, peritecio o apotecio como se observa en la figura 4. Sus paredes se componen de quitina principalmente.

Figura 4.

Chaetomium sp, perteneciente al Phylum Ascomycota



Nota. Adaptado de *Chaetomium sp, perteneciente al Phylum Ascomycota*, Arias y Piñeros, 2008, <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

www.bdigital.ula.ve

Phylum Basidiomycota. Este grupo se caracteriza por presentar basidiosporas que se producen en basidios, la forma del basidio juega un papel fundamental en la clasificación, aquellos que tienen septos se clasifican Phragmobasidiomycetes y aquellos sin septos en Homobasidiomycetes. El cuerpo fructífero sexual se denomina basidiocarpo, sus hifas son septadas y los septos son simples o con doliporos, como se observa en la figura 5.

Figura 5.

Setchelliogaster sp, perteneciente al Phylum Basidiomycota



Nota. Adaptado de *Setchelliogaster sp*, perteneciente al Phylum Basidiomycota Arias y Piñeros, 2008, <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Hongos Mitospóricos. Se conocían como hongos imperfectos y después como *Deuteromycetes*. Se denominaron imperfectos por su ausencia de una fase sexual en su ciclo de vida y se conocen como hongos mitospóricos porque sus esporas se producen por división nuclear mitótica. Las hifas son septadas, la mayoría son anamorfos y sus condiosporas se conocen como conidios, los cuales pueden ser de dos tipos: tálico si proviene de la segmentación de segmentos preexistentes de hifas y blástico cuando hay un alargamiento del conidio inicial antes de septarse (Arias y Piñeros, 2008).

Ascomycota. La característica distintiva de los *Ascomycetes* en relación con todos los otros hongos es el asco, una célula en forma de saco que contiene usualmente un definido número de ascosporas después de cariogamia y meiosis. Ocho ascosporas se forman generalmente dentro del asco, pero este número puede variar desde uno a más de cien de acuerdo con las especies. Otras características de los *Ascomycetes*, es que tienen un micelio septado, ocurre la producción por la mayoría de las especies de un cuerpo fructífero envolviendo el asco, y la ausencia completa de células con flagelos.

Los *Ascomycetes* en general tienen dos fases reproductivas distintas: el asco o estado sexual, llamado a menudo el estado ascígero o perfecto, y el estado conidial o asexual, designado a menudo con el estado imperfecto.

El micelio de los *Ascomycetes* está compuesto de hifas septadas, cuyas paredes contienen gran proporción de quitina; celulosa también ha sido reportado en las hifas de una o dos especies. Las hifas son bien desarrolladas, delgadas o gruesas, septadas, y profusamente ramificadas. En la mayoría de los *Ascomycetes* existe un hueco o poro cerca del centro del septo de las hifas a través del cual fluye el protoplasma de una célula a otra.

La reproducción asexual en los *Ascomycetes* puede producirse por fusión, fragmentación, clamidósporas, o conidios de acuerdo a la especie y las condiciones ambientales.

La reproducción sexual en los *Ascomycetes* se lleva a cabo por la unión de dos núcleos compatibles. Estos núcleos son juntados en la misma célula por uno de los muchos métodos desarrollados por los *Ascomycetes* durante su evolución. La fusión nuclear tiene lugar eventualmente en la célula madre del asco, la cual se desarrolla en el asco. La meiosis del núcleo cigote diploide, ocurre casi inmediatamente después de la fusión, para producir cuatro núcleos

haploides. Estos cuatro núcleos se dividen una vez más mitóticamente, y forman ocho núcleos que se convierten en las ocho ascosporas producidas típicamente en el asco. Los *Ascomycetes* para juntar los dos núcleos compatibles en una célula emplean los siguientes métodos: copulación gametangial, contacto gametangial, espermatización o somatogamia.

El asco puede tener diversas formas: globosa, cilíndrica o alargada, y su membrana externa puede estar formada por una sola túnica (unitunicada) o de dos (bitunicada). Las ascosporas pueden estar dispuestas irregularmente en el asco, pero más frecuentemente en hileras (Subero, s.f).

Penicillium. La etimología de *Penicillium* viene de cepillo, ya que los conidióforos (estructuras que producen las esporas asexuales) son ramificados.

Es un género que se ubica en la división de phylum *Ascomycota*. Fue descrito por primera vez por el micólogo alemán Heinrich Link en 1809 y su taxonomía ha sido compleja.

En principio fue ubicado en los *Deuteromycetes* (hongos imperfectos), ya que sólo se conocía su estado anamorfo (asexual). Posteriormente se comprobó que *Penicillium* se correspondía a los estados teleomorfos (sexuales).

El estado anamorfo de *Penicillium* se caracteriza por presentar hifas hialinas (incolores) septadas y los micelios forman filamentos. Cuando se colocan en medios de cultivo en laboratorio, las colonias en principio son blancas y luego se tornan desde azules, verde azuladas, verdosas amarillentas, hasta rosadas. Estas contienen un micelio compacto con márgenes bien definidos, son de rápido crecimiento y tienen aspecto lanoso o algodonoso.

Las esporas sexuales (ascosporas) se producen en ascos (cuerpos fructíferos) que pueden ser leñosos o de textura más suave según el género.

La característica más resaltante del género es el desarrollo de conidióforos ramificados en forma de cepillo. Los distintos tipos de ramificación del conidióforo permiten diferenciar a las especies. El conidióforo está bien estructurado y presenta un eje a partir del cual se forman ramificaciones (métulas). Sobre las métulas se forman las fiálides, las cuales son células en forma de botella que producen los conidios (Gómez, s.f).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C-30°C, aunque dependiendo de la especie puede crecer en el intervalo de 5°C-37°C; también tolera grandes variaciones de pH entre 3,5-10, aunque crece mejor y más rápido a pH cercano a 4 (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016).

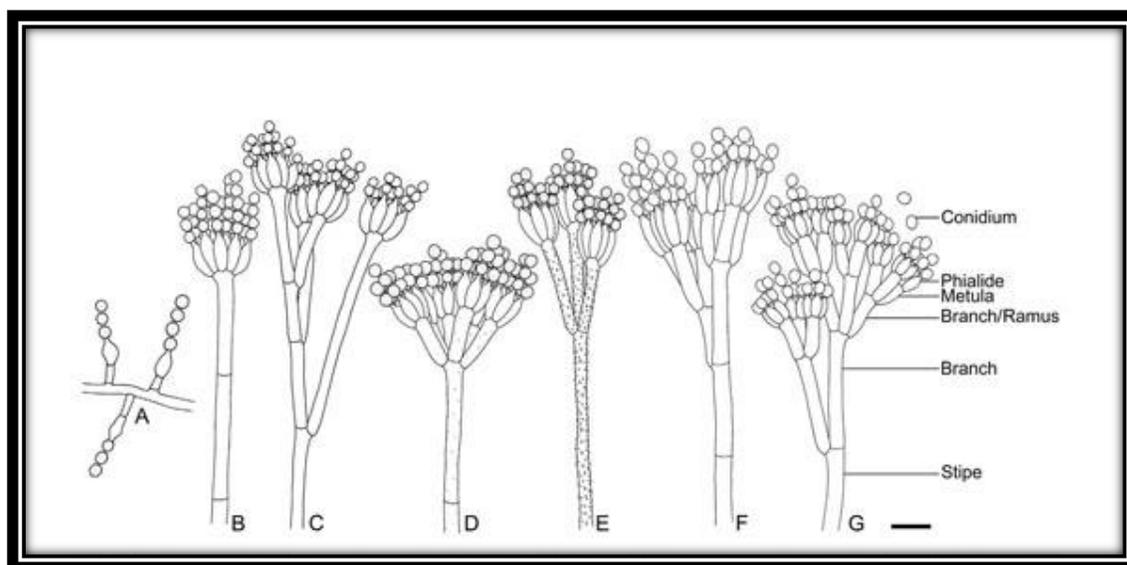
- **Tipos de conidióforos**

www.bdigital.ula.ve

1. **Simples:** las fiálides se presentan solitarias.
2. **Monoverticilados:** un grupo de fiálides se presentan en el ápice del eje del conidióforo.
3. **Divicariados:** las métulas se ramifican a distintas alturas y sobre estas se presentan grupos de fiálides.
4. **Biverticilados:** en la punta del eje se forman tres o más métulas, cada una con un grupo de fiálides en el ápice.
5. **Terverticilados:** presentan una serie de ramificaciones intermedias entre las métulas y fiálides, como se observa en la figura 6

Figura 6.

Ramificaciones de conidióforos observados en el género Penicillium.



Leyenda: A) Conidióforo con fiálides solitarias. B) Monoverticilados. C) Divicariados. D,E) Biverticilados. F) Terverticilados. G) Cuaterverticilados, Términos utilizados para describir partes de conidióforos.

Nota. Adaptado de *Patrones de Ramificación de Conidióforos observados en Penicillium*, Visagie et al, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

- **Reproducción**

Las especies de *Penicillium* se reproducen asexual y sexualmente

a. Reproducción asexual

La forma más común de reproducción asexual es la producción de conidias (esporas asexuales) a partir de los conidióforos. Estas se forman a partir de la división del núcleo de las fiálides.

b. Reproducción sexual

Las esporas sexuales son producidas en los ascos. Se genera un anteridio (estructura masculina) y el ascogonio (estructura femenina). Los citoplasmas de ambas estructuras se fusionan (plasmogamia) y luego se unen los núcleos (cariogamia).

Una vez que se forma la célula diploide, ocurre la meiosis. Se forman cuatro células haploides que sufren una mitosis, por lo que se producen ocho ascosporas (Gómez, s.f).

Penicillium candidum. Es una especie de hongo, del género *Penicillium*, Familia *Trichocomaceae*, Orden *Eurotiales*, Clase *Euascmycetes* y de la división *Ascomycota*. Se utiliza en la producción de quesos Camembert, Brie, Langres, Coulommiers y Cambozola, en los que las colonias de *P. candidum* forman una costra blanca y dura. Es el encargado de dar a estos quesos su sabor característico.

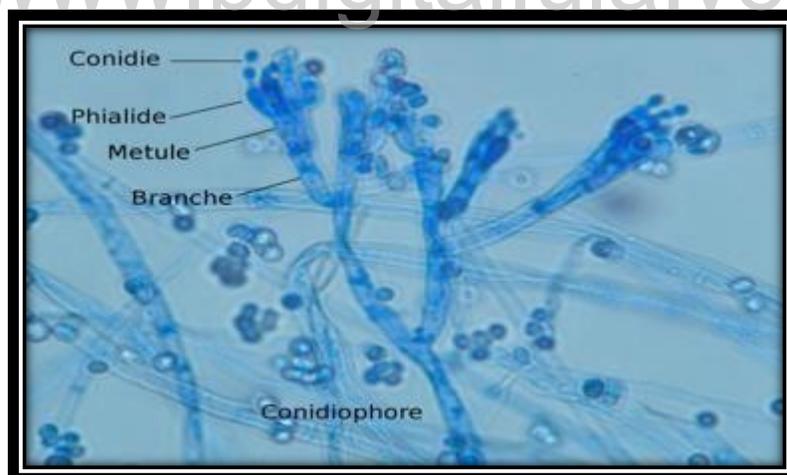
Mediante técnicas de PCR, los fabricantes de queso pueden controlar la elaboración de queso mediante el seguimiento del crecimiento micelial de *P. candidum*. Esto es particularmente significativo, ya que controlar el crecimiento es importante para mantener los niveles deseables de compuestos para el sabor (Garge, 2020).

Penicillium candidum juega un papel importante en el sabor y apariencia de los quesos tipo Camembert. Durante la maduración existe un aumento de concentración de esporas al agotarse la lactosa especialmente en los quesos madurados a 16 ° C. La esporulación se asocia con una gran disminución de la concentración de micelios en los quesos madurados a 16 ° C y 98% de humedad relativa. Se plantea la hipótesis de que la lactosa es la principal fuente de energía para el crecimiento del micelio de *P. candidum* al comienzo de la maduración y que su agotamiento desencadenaría estrés, lo que provocaría la esporulación (Leclercq et al. 2013).

Su caracterización microscópica, se puede observar en la figura 7

Figura 7.

Penicillium candidum. Observación Microscópica



Nota. Adaptado de *Penicillium camemberti*, Garge, 2020, <https://alchetron.com/Penicillium-camemberti>.

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En los laboratorios de microbiología se utilizan diferentes tipos de medios de cultivo que pueden ser preparados en forma líquida o en forma sólida. Usualmente para preparar un medio sólido, se parte de un medio líquido al que se le añade un agente solidificante como el agar, la gelatina o la sílica gel.

Los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo:

A la naturaleza de sus constituyentes

Medios naturales o complejos. Constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal, las que son usualmente complementadas por la adición de minerales y otras sustancias.

Medios definidos o sintéticos Son los medios que tienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Generalmente se usan en trabajos de investigación.

Uso del medio de cultivo

Medios de enriquecimiento. Son medios líquidos que favorecen el crecimiento de un tipo de microorganismo en particular. Permiten aumentar el número de microorganismos de ese tipo.

Usualmente contienen una o más sustancias inhibitoras del crecimiento de los microorganismos con excepción de los que se quieren cultivar.

Medios selectivos. Son parecidos a los de enriquecimiento, se diferencian por ser medios sólidos y están diseñados para el aislamiento de microorganismos específicos.

Medios diferenciales. Son medios que contienen indicadores de productos derivados de la actividad microbiana de los microorganismos. No contienen ningún tipo de sustancia con actividad antimicrobiana. Permiten revelar características fisiológicas de los microorganismos.

Los medios de cultivo se pueden preparar en el laboratorio a partir de cada uno de sus constituyentes básicos, o por simple rehidratación de productos asequibles comercialmente (medios de cultivo deshidratados). Generalmente se prefiere el uso de los medios de cultivo deshidratados porque, además de simplificar el trabajo, con ellos se tiene mayor probabilidad de obtener resultados reproducibles.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado, puede almacenarse a temperatura ambiente por un periodo máximo de 2 semanas protegido de la luz, o por periodos mayores a 12 -15°C. Sin embargo, almacenados bajo refrigeración entre 2 y 8°C se prolonga la vida útil de los mismos, (nunca por debajo de 0°C porque se destruye la estructura del gel).

Otro punto importante a tomar en cuenta, es que cada lote de medio de cultivo preparado debe pasar por un riguroso proceso de control de calidad, en donde se determinan sus propiedades fisicoquímicas (aparición, pH, etc.) y microbiológicas (esterilidad y promoción de crecimiento) verificando que cumplan con los requisitos de calidad establecidos y por ende demostrar que son aptos para su uso (Garcés y Saravia, 2008).

Agar Extracto de Malta. El extracto de malta es un extracto deshidratado de malta para su uso en la preparación de medios de cultivo microbiológicos en un entorno de laboratorio. El extracto de malta no está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos (Seguridad Alimentaria, Neogen, comunicación personal, 13 de octubre de 2019).

Es particularmente adecuado para levaduras y hongos, ya que contiene una alta concentración de maltosa y otros sacáridos que actúan como fuentes de energía. La dextrina y la glicerina son las fuentes de carbono, y la peptona es una fuente de nitrógeno. Agar bacteriológico es el agente solidificante. El pH ácido del agar de extracto de malta (pH: $4,7 \pm 0,2$ a 25°C) es óptimo para el crecimiento de levaduras y hongos, mientras que restringe el crecimiento de otras bacterias. Utilizado principalmente para la industria azucarera, en la fabricación de jarabes, refrescos y otras bebidas (Ficha Técnica MCD LAB, comunicación personal, s.f).

Agar Papa Dextrosa. El agar papa dextrosa es un medio de cultivo nutritivo sólido, no selectivo. En él pueden crecer especies bacterianas y fúngicas, pero su uso está indicado especialmente para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras. También es conocido como medio PDA por la expresión en inglés Potato Dextrose Agar.

Es particularmente útil para el aislamiento de hongos fitopatógenos, es decir, aquellos que afectan a los vegetales. Para sembrar las muestras provenientes de vegetales infectados se pueden usar otros medios como el agar Sabouraud o malta- agar, sin embargo, para el uso rutinario se prefiere el agar papa dextrosa por obtenerse mayor esporulación.

El medio papa dextrosa es un medio muy sencillo y fácil de preparar en el laboratorio. Contiene, como su nombre lo indica, infusión de papa, dextrosa y agar-agar. Adicionalmente pueden agregársele sustancias inhibidoras para evitar el crecimiento bacteriano y aumentar la selectividad para especies de hongos.

La combinación de la infusión de papa con la glucosa proporciona la fuente de energía perfecta para que exista un crecimiento satisfactorio de los hongos. Mientras que el agar es quien brinda la consistencia al medio.

El medio por sí solo no inhibe el crecimiento de las bacterias, por tanto, es un medio no selectivo. Para hacerlo selectivo necesita el agregado de sustancias inhibidoras como el ácido tartárico o los antibióticos (Gil, s.f.-a).

Agar Arroz. El arroz tiene una composición que involucra un 70 a 80% de almidón, el cual es un polisacárido, que contiene amilosa y amilopectina, quienes a su vez están conformadas por cadenas de glucosa.

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Cándida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*.

Una vez preparado tiene un aspecto: incoloro o amarillo suave, en medio sólido, transparente o traslúcido. Y tiene un pH a 25 °C de $5,6 \pm 0,2$ (Macalupú et al. 2017).

Agar Cloranfenicol. Agar Cloranfenicol (Agar YGC) es recomendado por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF), Organización Internacional de Estandarización (ISO) y

Deutsche Institute für Normung (DIN) para el aislamiento selectivo y enumeración de levaduras y mohos en leche y productos lácteos.

El método antibiótico para enumerar levaduras y hongos en productos lácteos es el método preferido de elección, ya que da como resultado una mejor recuperación de las células afectadas por hongos.

El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B, esencial para el crecimiento bacteriano. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía y el cloranfenicol es un antibiótico que ayuda a aislar los hongos patógenos del material altamente contaminado, ya que inhibe la mayoría de las bacterias contaminantes. Es un antibiótico recomendado para su uso con medios debido a su estabilidad térmica y amplio espectro bacteriano. El agar bacteriológico es el agente solidificante (Condalab, 2019).

Agua Peptonada. El agua peptonada es un medio de enriquecimiento líquido, no selectivo, utilizado principalmente como diluyente de muestras de alimentos u otros materiales. Este medio desde el punto de vista químico es muy simple, contiene peptona de carne, cloruro de sodio y agua.

Tiene cierto valor nutritivo, permitiendo enriquecer la muestra. Si existen bacterias maltratadas este medio tiene el poder de reparar la viabilidad. Además, el medio permite dispersar y homogenizar la muestra. Como diluyente es ideal, sustituyendo eficazmente a la solución fisiológica (SSF) o a la solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Las peptonas proporcionan los nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano, especialmente nitrógeno y aminoácidos de cadena corta, mientras que el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico.

El crecimiento bacteriano se hace evidente por la observación de la turbidez del mismo (Gil, s.f.-b).

Métodos de Siembra

Sembrar es el acto de colocar el material bacteriológico en el medio de cultivo para promover su crecimiento y desarrollo, y subsiguiente multiplicación. El resultado de una siembra se llama: Cultivo

Las siembras pueden ser:

- 1.- Primarias: cuando el material es inoculado en los medios por primera vez.
- 2.- Secundarias: cuando el material a inocular procede de una siembra primaria.

Métodos Generales:

1) Siembra por dilución: Se toma el tubo de ensayo con medio líquido, como el caldo simple. Se toma el material a diluir y se siembra en el tubo con el uso del asa cargada con el material bacteriológico, se agita, con movimientos moderados.

- Medio de cultivo: Líquido
- Instrumento: Asa
- Finalidad: poner la bacteria en suspensión.

2) Siembra por estrías en superficie: Se siembra el material en la superficie del agar inclinado en un tubo de ensayo, allí se extiende por toda la superficie con el asa bacteriológica, previamente esterilizada y cargada con el material a sembrar, haciendo estrías no muy amplias, pero tampoco muy estrechas. Se inicia por la parte más profunda de la superficie inclinada y se termina la estría en la parte más cerca de la boca del tubo.

- Medio de cultivo: agar base inclinado
- Instrumento: asa o aguja bacteriológica.

3) Siembra por estría por agotamiento: Con este procedimiento se puede conseguir una buena separación de las colonias y aislarlas fácilmente. Para ello se funde el medio de cultivo, se vuelca en caja de Petri y se deja solidificar. Con el asa previamente esterilizada se toma material de un cultivo heterogéneo y se descarga sobre la superficie del medio formando estrías. Esto puede realizarse de varias formas:

- a. Al comienzo se coloca el inóculo, luego se continúa con las estrías. Cuando se quiere obtener colonias muy separadas se puede utilizar dos o tres placas de Petri, para lo cual se repite la operación sin tomar con el asa nuevo material.
- b. Se puede dividir la placa de Petri en cuatro cuadrantes; una vez depositado el material en el primero, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, se hace una estría luego en el segundo, tercero y cuarto cuadrante sin cargar nuevamente el asa; en el último cuadrante aparecerán las colonias aisladas.

- c. El inóculo se extiende sobre una pequeña zona de la placa, próxima al borde, se esteriliza el asa y se traza otra estría a partir del depósito y así sucesivamente.

- Medio de cultivo: sólido en placa de Petri
- Instrumento: Asa
- Finalidad: Obtener colonias aisladas

Este método de siembra puede ser observado en la figura 8

Figura 8.

Siembra por estría por agotamiento



Nota. Adaptado de *Siembra por estría por agotamiento*, Jiménez, 2013, <http://microbiologiausd.blogspot.com/p/metodos-de-siembra.html>.

4) Por picadura o punción: Con una aguja se toma el material que se quiere sembrar y se lo introduce en el tubo, con medio semisólido. Se introduce la aguja hasta el fondo, formando un canal de punción, trayecto por el cual se retira luego. Este método se utiliza para estudiar la movilidad de las bacterias.

- Medio de cultivo: Semisólido
- Instrumento: aguja bacteriológica
- Finalidad: Estudiar la movilidad de las bacterias

5) Siembra en TSI: (Por picadura y estrías en superficie): el TSI (Triple Sugar Iron) es un medio que contiene glucosa, sacarosa y lactosa, hierro y un indicador que es el rojo fenol. En este medio se realiza la siembra por picadura y estrías en superficie, para estudiar los cambios que ocurrirán en superficie y profundidad. A lo largo del canal se desarrollan los microorganismos, y según lo hagan en la parte superior o inferior del tubo, estarán indicando su comportamiento frente a los azúcares, como se observa en la figura 9 (Jiménez, 2013).

Figura 9.

Siembra en TSI.



Nota. Adaptado de *Siembra en TSI*, Jiménez, 2013, <http://microbiologiauasd.blogspot.com/p/metodos-de-siembra.html>.

www.bdigital.ula.ve

Laminocultivo

El laminocultivo o microcultivo consiste en una técnica que permite observar el crecimiento microscópico de los hongos filamentosos sin tener que manipularlos.

El microcultivo es el procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas, pues permite visualizar al microscopio el micelio en su conjunto no solo una parte del mismo, como ocurre con el método de disociación pues, este método tiene el inconveniente de que solo permite visualizar al microscopio una parte del micelio. El mismo, consiste en colocar una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos. Con la espátula se toma una pequeña porción del cultivo que se deposita sobre la gota de colorante. Posteriormente se coloca un cubreobjetos calentando

suavemente para fundir el agar que se pueda haber arrastrado en la toma de la muestra, presionando ligeramente el cubreobjetos sobre el portaobjetos.

La preparación se observa al microscopio utilizando el objetivo de 10 aumentos para enfocar y tener una imagen general de todo el campo. Posteriormente se enfoca con los objetivos de 20 ó 40 aumentos para estudiar y observar mejor las estructuras microscópicas para su posterior identificación, siendo necesaria la consulta de las claves taxonómicas (*Laminocultivo*, 2014).

Estudio Morfológico de Hongos Filamentosos

Este estudio incluye las estructuras microscópicas del moho como tamaño y forma de los conidios, tipo de conidiogénesis, entre otros. Además de características macroscópicas de las colonias como diámetro de las colonias, textura, color, producción de pigmento difusible al medio, producción de exudado entre otros (Escardino, s.f).

Estudio Fisiológico de Moho *Penicillium candidum*

En el estudio Fisiológico, se realiza la enumeración de hongos, en la cual se contabiliza las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) del Moho *Penicillium candidum*; además, de cuantificar el peso seco del micelio o producción de biomasa para conocer el crecimiento del mismo.

Enumeración de Hongos. Para lograr la enumeración de las UFC/g del moho, se debe retirar con ayuda de un bisturí un cuadro de moho de 3,5 de largo por 3,5 de ancho, (lo cual implica un área de 12,5 cm²) de un cultivo en placa Petri, que haya cumplido con su tiempo de incubación. Posteriormente se pesa el moho extraído en una balanza de apreciación 0,0001g, se deposita en un mortero, y se adiciona agua peptona estéril para homogenizar, durante la trituración, luego se toma 1 ml y se diluye con 9 ml de citrato de sodio al 2%, es decir, con una razón de dilución (1:9). A continuación, se homogeniza, agitando unas 25 veces, con un movimiento de brazo que forme un ángulo de 45°.

Luego con una pipeta graduada se toma 1 mL de la dilución del moho con citrato de sodio al 2%, y se deposita en un tubo de ensayo estéril, en el cual previamente se ha vertido 9 mL de agua peptona estéril al 0,1% y a partir de esta solución madre, se preparan 8 diluciones seriadas es decir 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸. Dichas diluciones se siembran en medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa por duplicado a pH 3,5, acidificado con ácido tartárico al 2%. Las placas sembradas se llevan a incubación a una temperatura de 25°C durante 4 días.

Culminado el tiempo de incubación, las placas se observan en un contador de colonias, para determinar las UFC/g, siguiendo la norma Covenin 1337-90, la cual es empleada para Recuento de Mohos y Levaduras en Alimentos, esta se puede observar en el Apéndice A

En dicha norma, se estipula, que se deben seleccionar aquellas placas que presenten entre 10 y 100 colonias. Si las placas de todas las diluciones tienen más de 100 colonias, se deben seleccionar aquellas placas que tengan el valor más cercano a 100; mientras que, si las placas de todas las diluciones presentan menos de 10 colonias, se seleccionan aquellas placas que tenga el valor más cercano a 10.

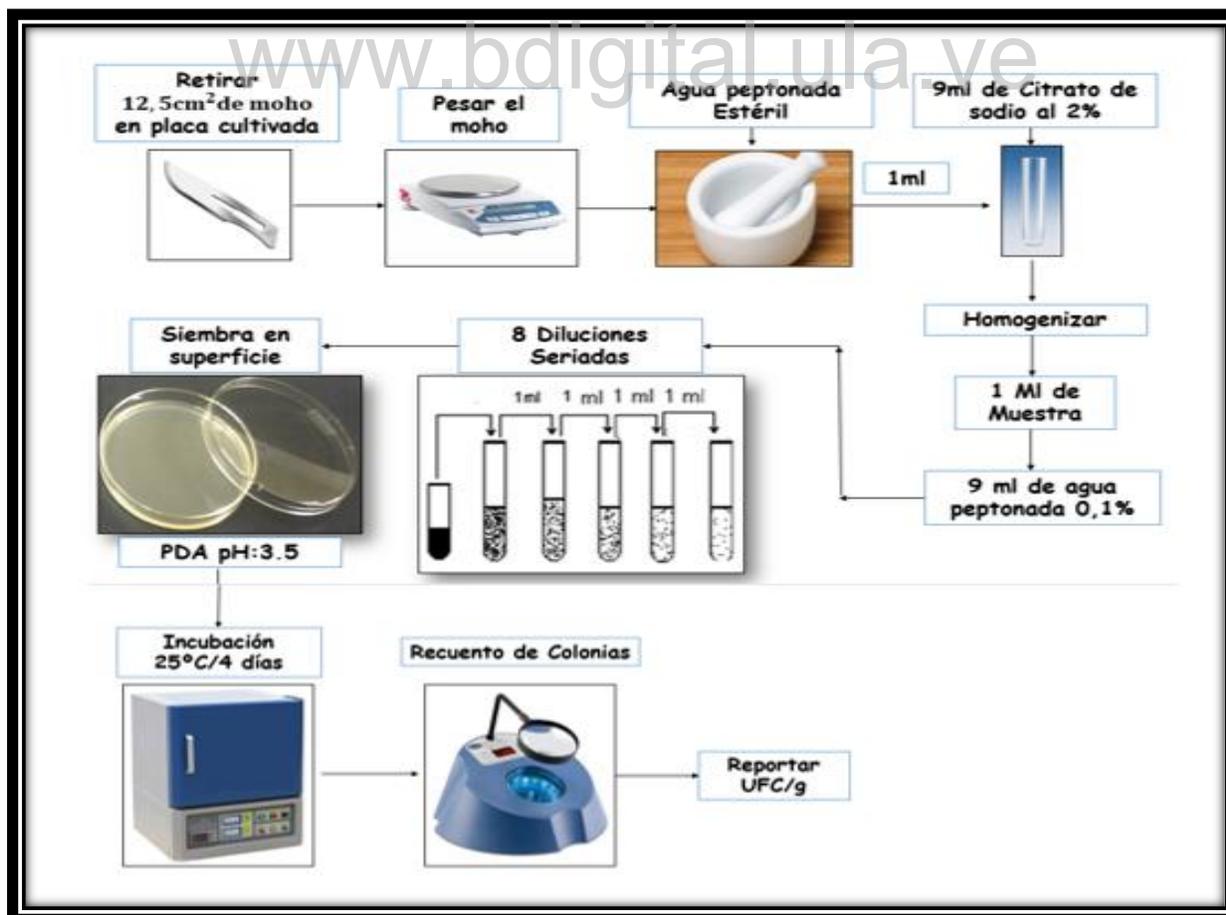
El número de colonias promedio de dos placas de una misma dilución, se multiplica por la dilución correspondiente y se expresa como “Estimado del Recuento estándar”

Si placas de dos diluciones decimales consecutivas presentan entre 10 y 100 colonias, se multiplica cada recuento por la dilución correspondiente, se establece el promedio y este será el resultado final. Si el recuento más alto es superior a dos veces el más bajo, se descarta y se toma como resultado el valor más bajo.

El número de colonias se expresa como UFC/g o ml. En la Figura 10, se puede observar el procedimiento a seguir, para realizar la enumeración de hongos.

Figura 10.

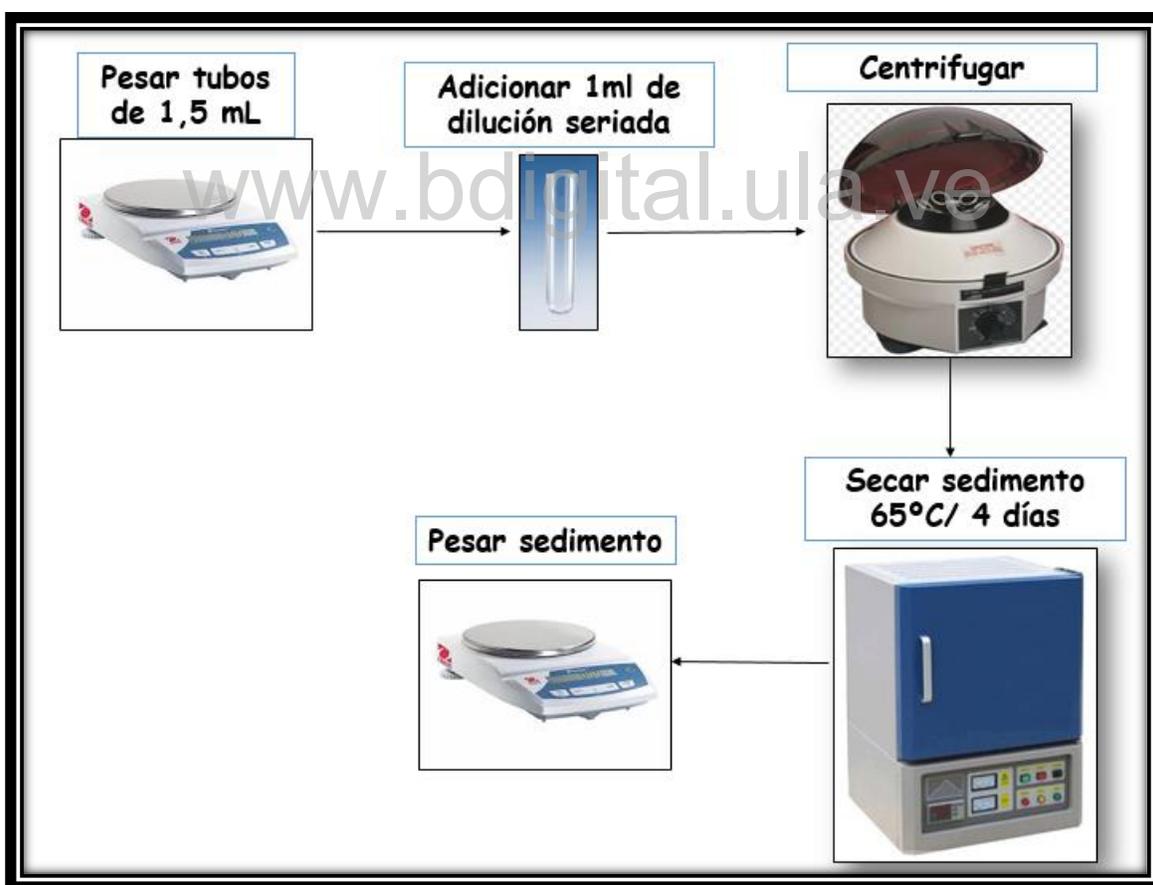
*Procedimiento para Enumeración de hongos (*Penicillium candidum*)*



Peso Seco del Micelio. Para determinar el peso seco del micelio, se toma con una pipeta graduada 1 ml de cada dilución seriada empleada en la enumeración de hongos, cada mililitro, se deposita en un tubo diferente de 1,5 mL de capacidad, los cuales deben estar previamente pesados, posteriormente se centrifuga y el sedimento se seca en una estufa a 65 °C por 4 días, luego de cumplir este tiempo se pesa. En la Figura 11, se muestra el procedimiento descrito (Lessard et al. 2012).

Figura 11.

*Procedimiento para realizar Peso seco del micelio del moho *Penicillium candidum**

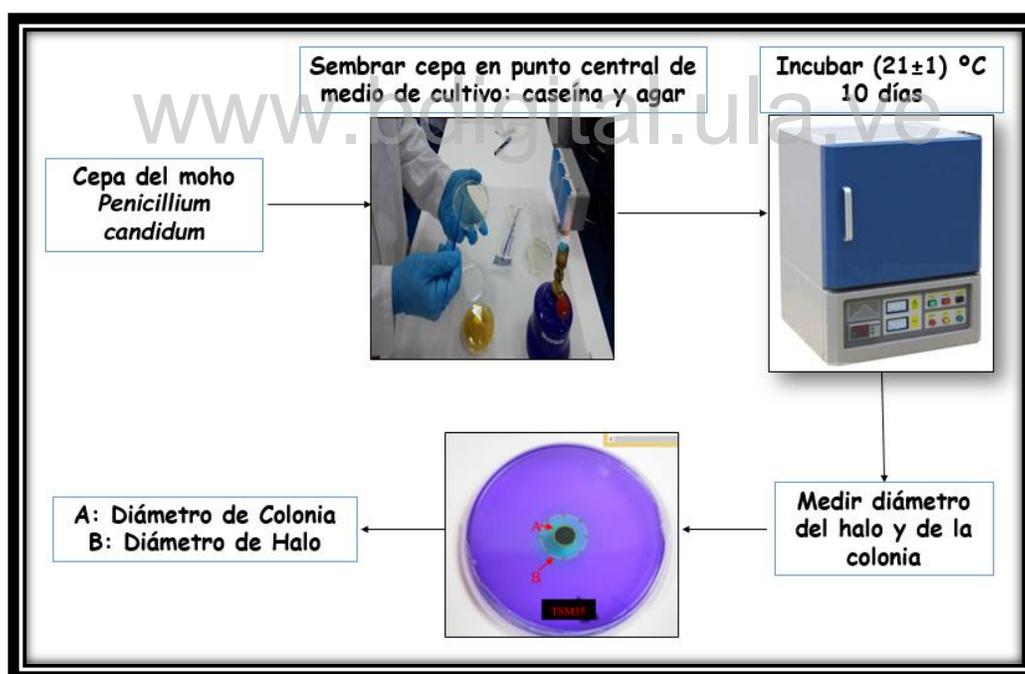


Estudio de Capacidad Proteolítica y lipolítica de las Cepas del moho Penicillium candidum.

Capacidad Proteolítica. Para estimar la capacidad proteolítica del moho, se siembran cepas del mismo en punto central de placas Petri que deben contener el medio de cultivo conformado por caseína y agar, estas se llevan a incubación a una temperatura de 21 ± 1 °C por 10 días. Pasado este periodo de tiempo, se mide el diámetro del halo y de la colonia, para determinar el índice de potencia. En la Figura 12, se observa este procedimiento (Godínez y Calderón, 2008).

Figura 12.

Procedimiento para medir Capacidad Proteolítica del Moho Penicillium candidum



El índice de Potencia se determina mediante la ecuación 1 (Maldonado et al. 2017).

$$IP = \frac{A_{Halo}}{A_{Colonia}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde,

IP: Índice de Potencia

A_{Halo} : Área del halo de actividad

A_{Colonia} : Área de la Colonia

Capacidad Lipolítica. Para llevar a cabo el estudio de la capacidad lipolítica del mohó *Penicillium candidum*, se siembran cepas del mismo en punto central de placas petri, las cuales deben contener medio de cultivo de triptona, extracto de levadura, agar y aceite de soya. Se lleva a incubación a una temperatura de 21 ± 1 °C por 7 días y pasado este lapso de tiempo se añade rojo neutro a las placas y se determinará el índice de potencia como se muestra en la ecuación 1, indicando que el procedimiento es similar al estudio de capacidad proteolítica (Godínez y Calderón, 2008).

Métodos de Conservación de Hongos Filamentosos

Agua destilada Estéril. Es un método que consiste en suspender en agua estéril un determinado número de células del microorganismo que se quiera conservar e incubarla de 20 a 25°C. Se han observado altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años, en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias, así como también se ha comprobado una buena estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos. Indicando que es un método de almacenamiento a largo plazo.

Suelo Estéril. El método consiste en esterilizar y secar el suelo, el cual es utilizado como medio absorbente para una pequeña cantidad de inóculo y usado para cultivos que producen esporas y estructuras de resistencia. Se puede preservar la viabilidad y características a temperatura ambiente o en refrigeración. Este es un método de almacenamiento a largo plazo.

Papel Filtro. Este método permite la conservación de células en papel filtro esterilizado, al inocular una solución de células para posteriormente realizar un tratamiento de secado y mantenerlo en congelación. También es posible desecarlos por desecación líquida (L-Dry) utilizando un liofilizador evitando un vacío excesivo. El mismo es un método de preservación a largo plazo.

Tubo con Agar Inclinado. Este tipo de técnica es utilizada con gran frecuencia para aplicaciones microbiológicas, especialmente en la conservación de cepas. Para ello se precisa una superficie grande de medio de cultivo, que se puede obtener mediante agar inclinado.

Los tubos llenos con medio de cultivo esterilizado, todavía líquido, se colocan en una posición inclinada, de manera que se forme una capa de aproximadamente 3 cm y una superficie inclinada de iguales dimensiones. El medio de cultivo se deja solidificar en la posición lograda, seguidamente se siembran los microorganismos que van hacer conservados a 4°C o 9°C. Este es un método de almacenamiento a corto plazo.

Criopreservación (Glicerol al 10%). El empleo de agentes crioprotectores protegen el daño que se puedan producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 10 al 20%. El glicerol es un líquido incoloro, muy espeso, de sabor dulce, es muy soluble en todas las proporciones en el agua y en el etanol, es

más pesada que el agua; en estado anhídrido es muy higroscópica, es decir, absorbe la humedad del aire, aumentando de volumen. El glicerol o glicerina líquida es resistente a la congelación, pero puede cristalizarse a baja temperatura.

El glicerol como crioprotectante baja la concentración de sales en equilibrio con el hielo a cualquier temperatura de congelación cuando está presente en el medio o cuando este ha penetrado la célula. También reduce el tamaño y la cantidad de cristales de hielo formado y es encontrado naturalmente como osmoregulador dentro de las células. Este método de conservación es a largo plazo.

Liofilización. Es un método para preservación a largo plazo, el proceso de liofilización implica la remoción de agua en el estado congelado utilizando la sublimación. Lo anterior se logra mediante la aplicación de vacío. Para mejor estabilidad y viabilidad se utilizan soluciones crioprotectantes, las cuales evitan la formación de cristales a nivel celular. Los equipos para liofilización tienen tres componentes: un mecanismo de congelamiento, una fuente de vacío y una trampa para el vapor de agua.

La liofilización tiene dos grandes ventajas sobre la criopreservación: no requiere almacenamiento del producto y al enviar el producto liofilizado no necesita de refrigeración. La viabilidad de la liofilización para hongos depende de la tasa de congelación, el tamaño de los propágulos, el espesor de la célula y la composición de los protectantes utilizados (Arias y Piñeros, 2008).

Queso Brie

El queso Brie, es un queso tradicional francés, que se clasifica entre los quesos de pasta blanda. Es un queso del que se tienen referencias de la época del emperador Carlomagno. Existen dos variedades de queso Brie, que atienden a su región de producción, y son Brie de Meux y Brie de Melun, siendo el primero de ellos el más famoso.

La denominación de queso Brie, alude a una pequeña zona cercana a la Isla de Francia en la región de la Champaña donde se produce. La fama y su consagración como rey de los quesos franceses, surgió en 1814 cuando fue el queso elegido durante una cena organizada por Talleyrand en el Congreso de Viena, en la que cada uno de los 30 embajadores asistentes llevó un queso de su elección (*El queso Brie. Nota de cata y características*, 2012).

Su maduración se da desde el exterior hacia el interior por el desarrollo superficial del *Bacterium linens* (rojo) y del *Penicillium candidum* (blanco). Se trata de una maduración que actúa velozmente, por lo que el queso debe ser consumido en períodos breves para evitar encontrarlo pasado y, en consecuencia, alterado.

Su forma es cilíndrica, con un diámetro de 20 a 30 cm, un espesor de 2 a 3 cm y un peso de 1 a 2 Kg. Tiene una corteza recubierta de un fieltro de moho blanco, pasta lisa de color amarillo pajizo, mantecosa y cremosa en su maduración. El gusto es aromático, ácido y con tendencia picante (Borregales, s.f).

El queso entero se puede cortar o formar en secciones, previa o posteriormente al desarrollo del moho. El procedimiento de maduración para desarrollar las características de sabor y cuerpo

dura normalmente 25 días como mínimo a una temperatura de 10–16 °C, según el grado de madurez requerido.

Durante la elaboración se puede agregar ingredientes como: Cultivos de bacterias inocuas del ácido láctico y/o productoras de sabor y cultivos de otros microorganismos inocuos, incluidos *Geotrichum candidum*, *Brevibacterium linens* y levadura, Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas idóneas, Cloruro de sodio y cloruro de potasio como sucedáneo de la sal, Agua potable, Enzimas inocuas idóneas para potenciar el proceso de maduración, Coadyuvantes de elaboración inocuos idóneos (Codex 277, 1973).

Requisitos Físicoquímicos del Queso Brie. En la Tabla 1, se puede observar los métodos de ensayo aplicados según la Norma Covenin 2850-92, para evaluar las características físicoquímicas del Queso Brie.

Tabla 1.

Requisitos Físicoquímicos del Queso Brie.

Característica	Limite		Método de Ensayo
	Min.	Máx.	
Humedad (%)	-	55	COVENIN 1945
Grasa (%) *	-	45	COVENIN 1814
Cloruro de sodio (%) m/m	-	3	COVENIN 369
Extracto Seco (%) m/m		45	---

Nota. *Expresada en base seca. Adaptado de *Requisitos Físicos y Químicos*, COVENIN 2850,1992, (<http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2850-92.pdf>)

Propiedades Organolépticas

A menudo nos preocupamos de analizar los alimentos que consumimos en cuanto a sus características organolépticas sin saber que lo estamos haciendo. Y es que cada vez que probamos un plato o un alimento y decidimos qué nos gusta o qué no nos gusta estamos haciendo un repaso de sus propiedades organolépticas, que no son más ni menos que olor, color, sabor, textura, tamaño, regusto... En fin, una objetivación de sus propiedades sensoriales que, en mayor o menos medida, subjetivamos según nuestros propios gustos.

Los alimentos destacan por sus propiedades organolépticas, que suponen particularidades que se miden a través de análisis sobre las sensaciones que producen al paladar de quien los consume. Este análisis sensorial se basa en cuatro parámetros básicos: color, sabor, textura y aroma. La función de estos cuatro parámetros básicos es dar las condiciones óptimas y peculiares de cada alimento para aportar sus mejores cualidades.

Sabor. Las papilas gustativas de la lengua son capaces de identificar cinco tipos de sabores: dulce, salado, amargo, ácido y umami. Cada una de las partes de la lengua es capaz de reconocer mejor uno u otro sabor, aunque todas las papilas pueden percibir todos los sabores. También se puede hablar de sabores inmediatos, como la acidez del ácido cítrico, y de sabores lentos, como la acidez del ácido málico (presente en algunas frutas y verduras con sabor ácido, sobre todo cuando no están maduras, como uvas, manzanas o cerezas).

Color. Este parámetro es un indicador de las reacciones químicas que se producen en los alimentos tras someterlos a algún proceso térmico, como cuando la carne se oscurece al cocinarla. Muchas de las variaciones de color son normales y no afectan a la inocuidad. La carne puede pasar

de un rojo brillante a un tono más oscuro en función de las condiciones externas, sobre todo si entra en contacto con aire y luz. En este caso, se da un cambio en la mioglobina, un pigmento que le aporta el color característico oscuro. Cuando esto pasa, no significa que esté deteriorada, sino que se ha producido una oxidación. Pero en ocasiones, el color puede ser una señal de deterioro.

Textura. Es una de las particularidades más diferenciadoras entre alimentos, clave en las preferencias de los consumidores. Esta propiedad la evalúan los estudios reológicos, que se centran en el análisis de aspectos como la viscosidad, el grosor, la dureza o la rigidez. Algunos alimentos cambian de aspecto y textura durante el almacenamiento, de ahí que las medidas reológicas se usen para predecir la estabilidad de vida útil. En alimentos como el helado, se busca evitar que se formen cristales grandes que, pese a no suponer un riesgo para los consumidores, sí pueden ser motivo de rechazo.

Aroma. Esta propiedad, considerada una de las más difíciles de definir y caracterizar, viene dada por distintas sustancias volátiles presentes en los alimentos, bien de manera natural o procedente de su procesado (a través de aditivos alimentarios, como los aromas artificiales). Se considera que los productos vegetales son más ricos en estos compuestos volátiles, que aparecen también como productos secundarios de reacciones enzimáticas como la reacción de Maillard o la caramelización de los azúcares.

Pero en general, las propiedades organolépticas son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene la materia, según puedan ser apreciadas por los sentidos, por lo que también entrarían en este apartado características como la temperatura, el tamaño, la evocación de un momento, el sonido en boca (Ojeda, 2018).

Capítulo III

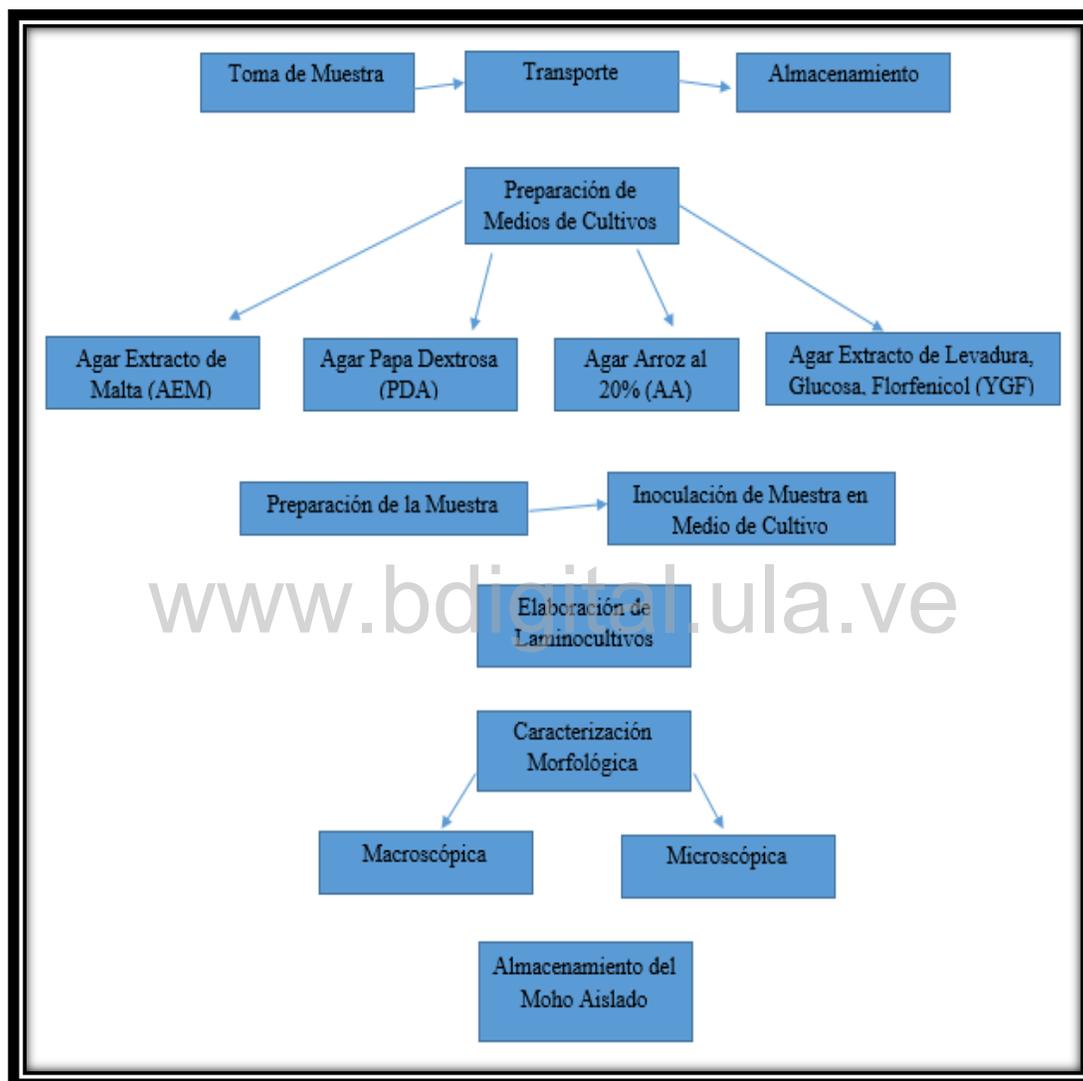
Metodología Experimental

Dada la revisión bibliográfica llevada a cabo, se puede resaltar la importancia que tiene el moho *Penicillium candidum*, sobre el Queso Brie, es por ello, que para lograr el aislamiento del moho a partir de un Queso Tipo Brie elaborado por Lácteos Santa Rosa, fue necesario seleccionar los mejores medios de cultivo para el crecimiento del moho en cuestión, según sus necesidades nutricionales como el Agar extracto de Malta (AEM); Agar Papa dextrosa (PDA); Agar Extracto de levadura, glucosa, florfenicol (YGF) y Agar arroz al 20% (AA). Una vez obtenido el moho aislado, este se caracterizó morfológicamente macro y microscópicamente, para lograr la identificación del *Penicillium candidum*. Por otra parte, para conservar el moho aislado para su posterior uso en la elaboración del Queso tipo Brie, se empleó un método de almacenamiento de corto plazo.

Para conseguir los objetivos planteados se siguió el protocolo descrito en la Figura 13.

Figura 13.

Protocolo para el aislamiento del Moho Penicillium candidum a partir de una muestra de un Queso Tipo Brie, fabricado por Lácteos, Santa Rosa.



Leyenda: Toma de Muestra, Transporte y Almacenamiento (Norma COVENIN 938-83), Preparación de Medios de Cultivos (López, et al. 2010), Preparación e inoculación de la Muestra en los medios de Cultivo (Norma Covenin 1126-89, 1337-90), Caracterización Morfológica (López, et al. 2010), Almacenamiento del Moho Aislado (Arias y Piñeros, 2008).

Toma de Muestra, Transporte y Almacenamiento del Queso Tipo Brie de Lácteos Santa Rosa

Una Muestra del Queso Brie, fue extraída al 8vo día de maduración, para ello el cuchillo empleado estuvo debidamente esterilizado, además el recipiente usado se mantuvo seco y limpio. Así mismo, no se añadieron conservantes, ya que esta sería expuesta a un análisis microbiológico, la muestra fue llevada al laboratorio en el menor tiempo posible, se cuidó que durante el transporte la misma no se expusiera directamente al sol y se almacenó a una temperatura de Refrigeración de 4°C, siguiendo la Norma Covenin 938-83, que indica los Métodos para la Toma de Muestras de Leche y Productos Lácteos, ver Apéndice B.

Preparación de los Medios de Cultivo

Los Medios de Cultivo empleados fueron los aplicados y descritos por López et al. (2010)

- **Agar extracto de Malta (AEM)**

Para su preparación se empleó extracto de malta, agar y agua esterilizada, según la formulación descrita en la Tabla 2.

Tabla 2.

Formulación de Agar Extracto de Malta (AEM).

Componentes	g/L de Agua Esterilizada
Extracto de Malta	30
Agar	15

Nota. Adaptado de *Agar Malta*, COVENIN 1337, 1990, <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1337-1990.pdf>

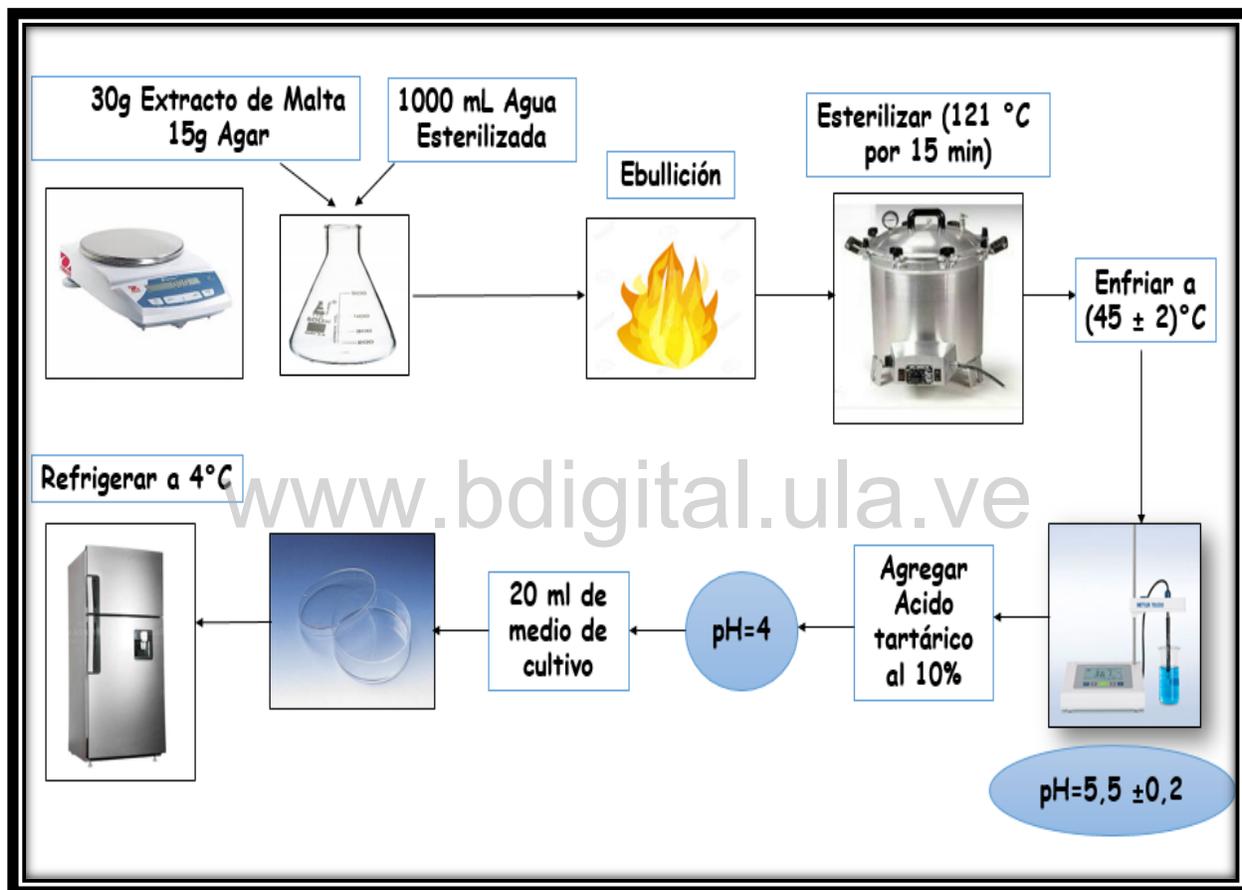
En una balanza digital de apreciación 0,0001g se pesó 30g de extracto de malta y 15g agar, luego estos fueron depositados en un Erlenmeyer y se adicionó 1000mL de agua esterilizada. Posteriormente se llevó a una plancha de calentamiento, se agitó hasta que se disolvió completamente o hasta ebullición. Luego se tapó la boca del recipiente con un tapón de gasa y algodón, se llevó a esterilizar en un autoclave por 15 minutos a 121°C, se dejó enfriar a 45°C ± 2°C, se midió su pH, con un pH-metro, el cual fue de 5,5 ± 0,2; se disminuyó el mismo alrededor de 4, con una solución de ácido tartárico al 10%, con el fin de brindar un mejor medio para el crecimiento del *Penicillium candidum* y a su vez inhibir el crecimiento bacteriológico; 20 ml de este medio fueron depositados en placas Petri y 15 ml en tubos de ensayo, se dejó enfriar y solidificar en una posición inclinada para que se generara la mayor área de contacto entre el medio de cultivo y la muestra que se inocularía. Tanto las placas Petri como los tubos de ensayo, estuvieron previamente esterilizados por calor en seco, mediante aire caliente, a una temperatura de 170°C por 2 horas. Es importante mencionar que el vertido del medio en placas y tubos, se realizó en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de los mismos. Hasta su utilización, fueron refrigerados a 4°C aproximadamente.

Por otro lado, la solución de ácido tartárico, fue preparada disolviendo 10 g de ácido tartárico en 100 ml de agua esterilizada, y se adicionó la cantidad necesaria de esta solución para acidificar el medio de cultivo en cuestión, en este caso el agar Extracto de Malta. Importante destacar, que una vez sea añadida la solución de ácido tartárico al 10%, el medio de cultivo no se sometió a calentamiento, ya que podría hidrolizarse el agar y esto provocaría la pérdida de sus propiedades gelificantes.

El procedimiento seguido para preparar este medio, se puede observar en la figura 14.

Figura 14.

Procedimiento para la Preparación de Medio de Cultivo Agar Extracto de Malta (AEM)



- **Agar Papa Dextrosa (PDA)**

Este medio de Cultivo, fue preparado como se indica en la Tabla 3

Tabla 3.

Formulación de Agar Papa Dextrosa (PDA).

Componentes	g/L de Agua Esterilizada
Papa	200
Dextrosa	20
Agar	20

Nota. Adaptado de *Agar Papa Dextrosa*, COVENIN 1337, 1990, <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1337-1990.pdf>

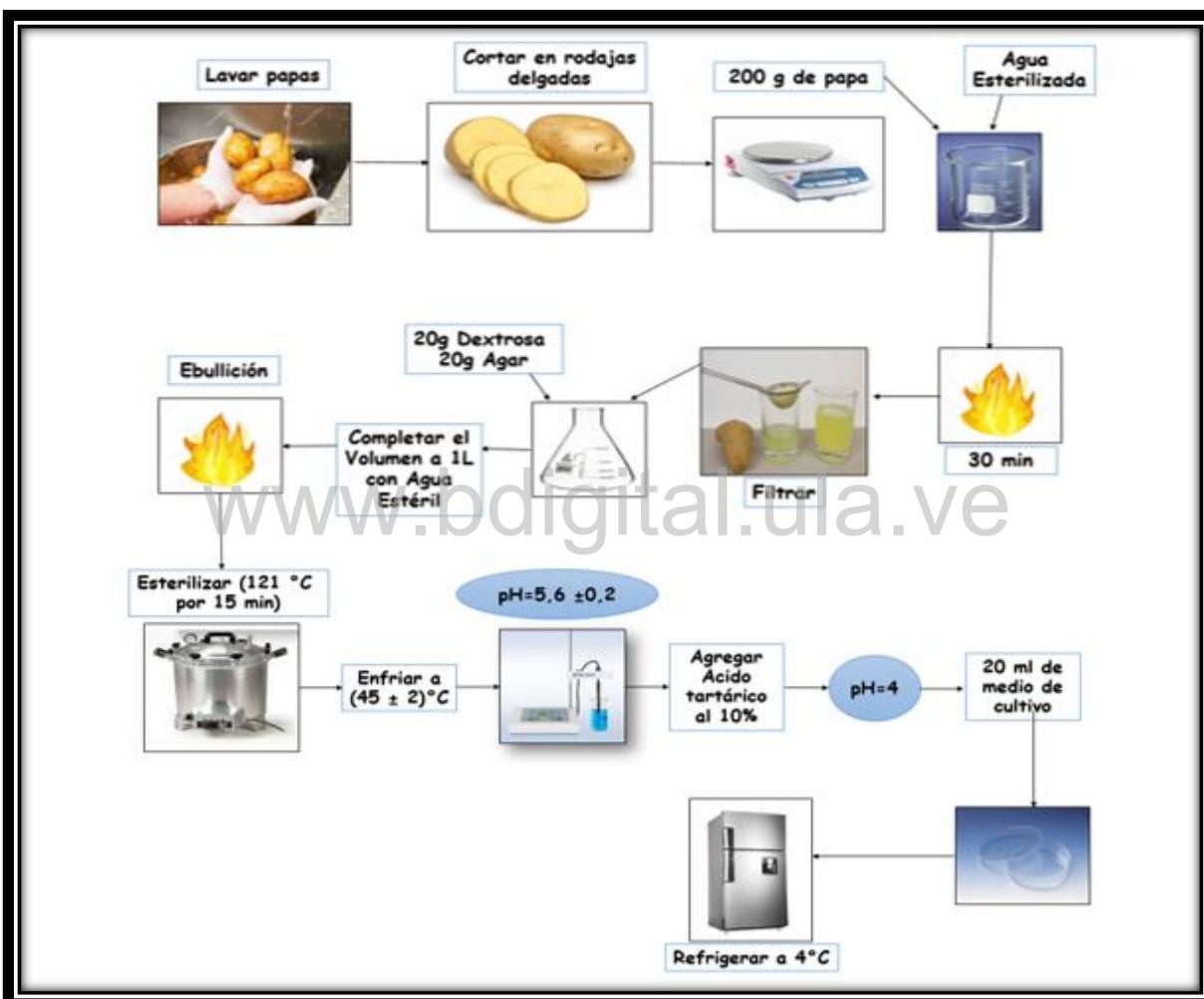
Para preparar la infusión de papa, se lavaron y cortaron las papas en rodajas delgadas, posteriormente se pesó 200g en una balanza analítica de apreciación 0,0001 g, luego se llevó a un vaso de precipitado con agua esterilizada para ser cocinada por un tiempo de aproximadamente 30 min. Esta se filtró y la infusión obtenida se vertió en un Erlenmeyer al cual se le adicionó 20g de dextrosa, 20g de agar y se completó el volumen a 1000mL con agua estéril. Luego se llevó a ebullición en una plancha de calentamiento hasta disolver por completo y posteriormente se esterilizó en una autoclave a 121 ° C por 15 minutos. El procedimiento a seguir, fue igual al mencionado en el Agar Extracto de Malta.

En este medio de cultivo, el pH antes de la adición de la solución de ácido tartárico al 10% fue de $5,6 \pm 0,2$ y luego de la adición 4,3

En la figura 15 se observa el procedimiento que se realizó para la preparación del Agar Papa Dextrosa.

Figura 15.

Procedimiento para la Preparación del Agar Papa Dextrosa (PDA)



- **Agar Arroz al 20% (AA)**

Los componentes empleados durante la preparación de este medio de cultivo, se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4.

Formulación de Agar Arroz al 20% (AA)

Componentes	g/L de Agua Esterilizada
Arroz	200
Agar	18

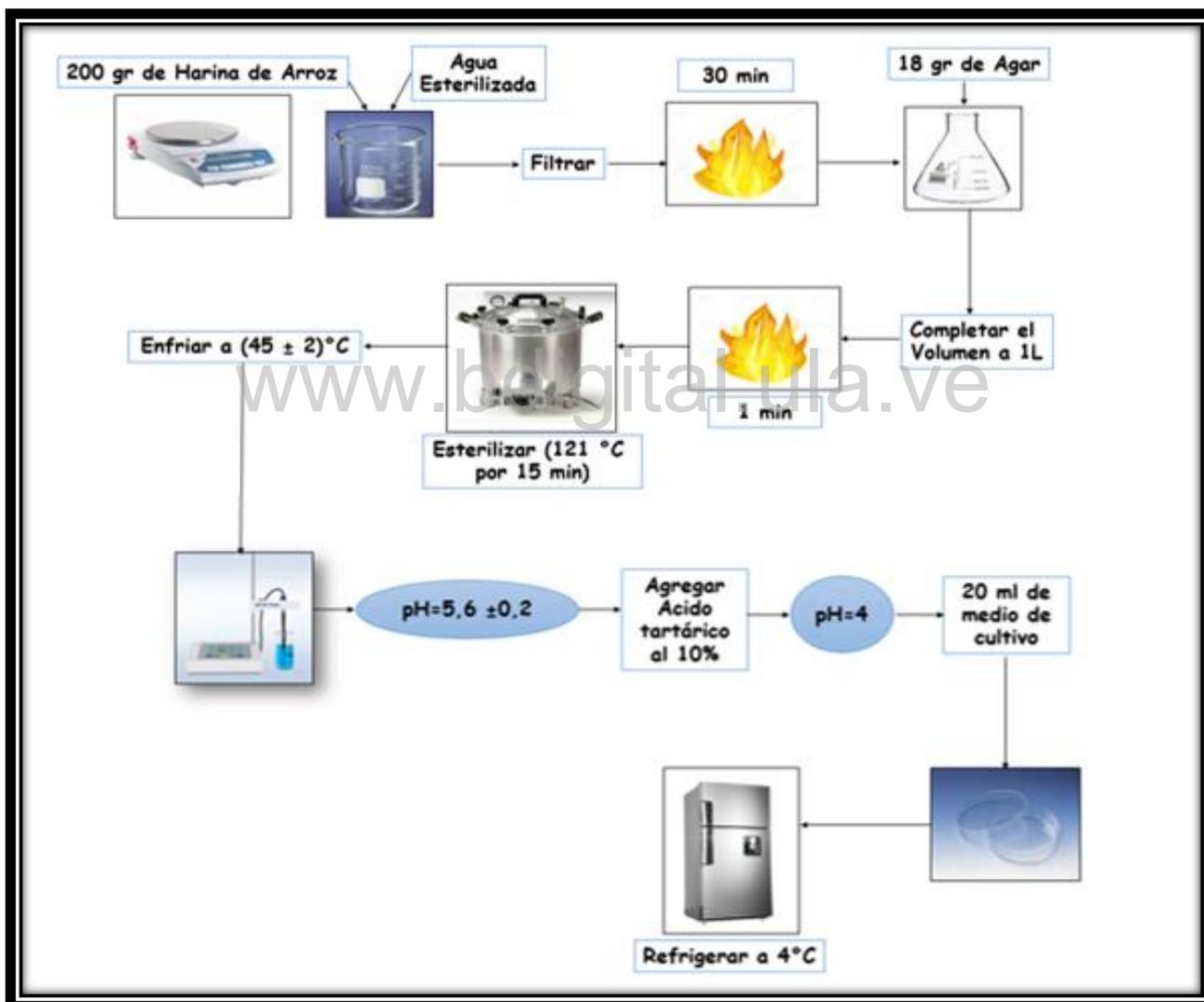
Nota. Adaptado de *Agar Arroz*, Macalupú et al, 2017, <https://docer.com.ar/doc/x55001>.

Para una mejor preparación, el arroz se pulverizó, para que los componentes de este pudieran incorporarse mucho mejor en la infusión o agua de arroz. Se pesó 200g de harina de arroz en una balanza analítica de apreciación 0,0001g, se depositó en un vaso de precipitado, se añadió agua estéril, se agitó con una varilla unos minutos, posteriormente se filtró y se hirvió la infusión por 30 minutos en una plancha de calentamiento, luego se vertió en un Erlenmeyer, se añadió los 18 gr de agar y la cantidad de agua estéril necesaria para completar 1000 ml de medio. Seguidamente se llevó a ebullición por 1 minuto, se colocó en la boca del erlenmeyer un tapón de algodón y gasa, se llevó a esterilización en una autoclave a una temperatura de 121 ° C por 15 minutos. Luego se siguió el procedimiento descrito con anterioridad para los medios AEM y PDA.

Este medio de cultivo tuvo un pH de $5,6 \pm 0,2$, antes de la adición de ácido tartárico, luego de ello su pH disminuyó a 4,2. En la Figura 16 se observa el procedimiento de preparación descrito.

Figura 16.

Procedimiento para la Preparación del Agar Arroz al 20% (AA)



- **Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF)**

La formulación de este medio de cultivo se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5.

Formulación de Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF).

Componentes	g/L de Agua Esterilizada
Extracto de Levadura	5
Dextrosa	20
Florfenicol	0,1
Agar Bacteriológico	12
Total	37,1

www.bdigital.ula.ve

Nota. Adaptado de *Agar Cloranfenicol (Agar YGC) ISO*, Condalab, 2019, https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1075-11035-agar-cloranfenicol-agar-ygc-iso.html#/2-formato-500_g

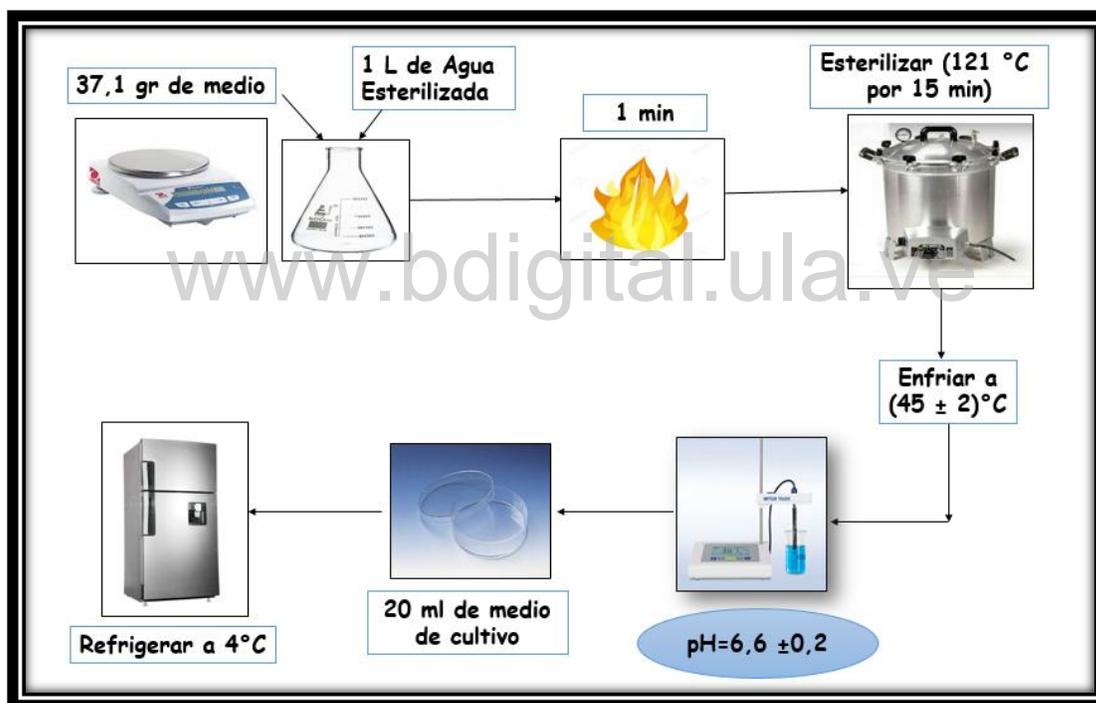
Los componentes descritos en la Tabla N° 5, fueron pesados en una balanza analítica de apreciación 0,0001g, se depositaron en un Erlenmeyer y se adicionó 1000 ml de agua esterilizada, se agitó para diluir por completo la mezcla y se llevó a ebullición por un minuto en una plancha de calentamiento, se colocó un tapón de algodón y gasa en la boca del Erlenmeyer y se esterilizó en un autoclave a 121°C por 15 minutos, luego se dejó enfriar, a (45±2) °C. Se midió el pH con un pH- metro, el cual fue de 6,6±0,2. Se sirvió aproximadamente 20 ml de medio de cultivo en placas Petri y 15 ml en tubos inclinados, como se explicó anteriormente. Luego fueron almacenados en refrigeración a 4°C.

Debido a que este medio de cultivo contiene Florfenicol, no fue necesario adicionar la solución de ácido tartárico al 10%, ya que este es un antibiótico que tiene como función inhibir el crecimiento bacteriológico.

El procedimiento para la preparación de este medio de cultivo se muestra en la Figura 17.

Figura 17.

Procedimiento para la Preparación del Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF)



- **Agua Peptonada**

En la Tabla 6, se puede observar la composición del agua peptonada preparada.

Tabla 6.

Formulación de Agua Peptonada

Componentes	Cantidad
Medio Deshidratado (Peptona Bacteriológica)	15 g
Agua Esterilizada	1 L

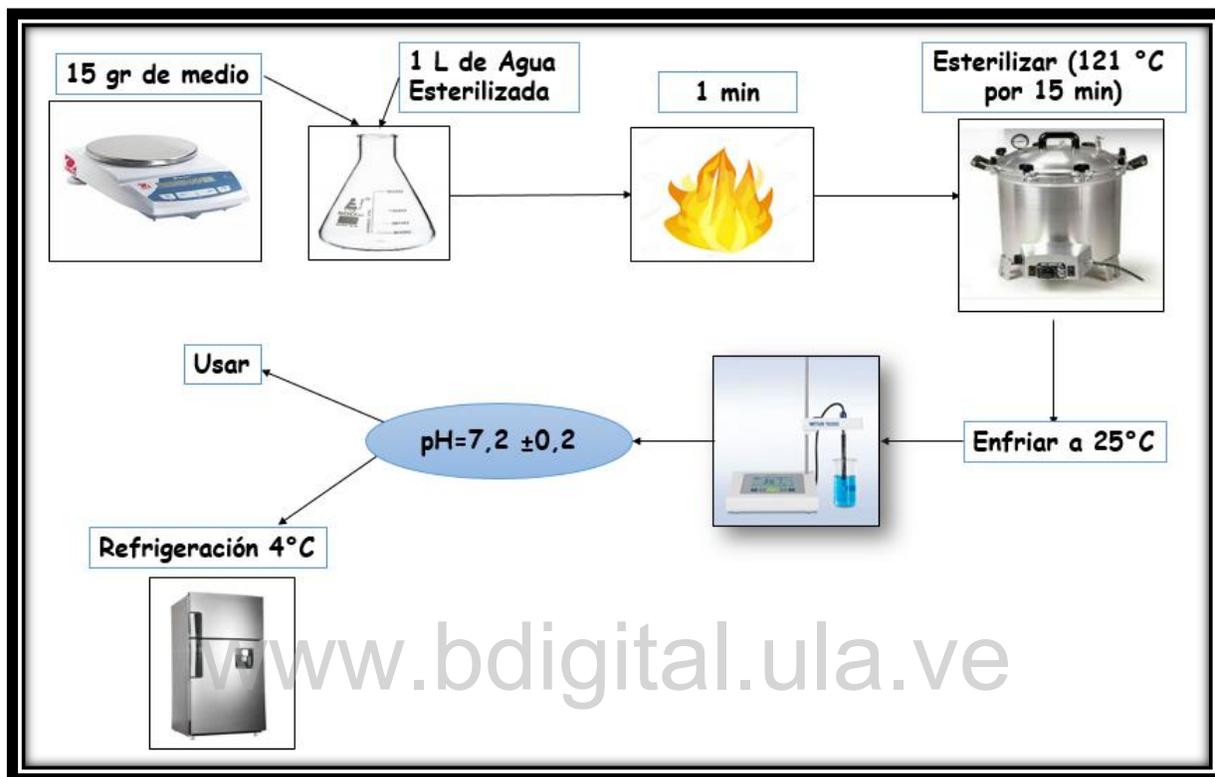
Nota. Adaptado de *Agua Peptonada*, Gil, s.f, <https://www.lifeder.com/agua-peptonada/>.

www.bdigital.ula.ve

Se pesó 15g de medio deshidratado en una balanza analítica de apreciación 0,0001g, se depositó en un Erlenmeyer y se diluyó con 1000 ml de Agua Esterilizada, posteriormente se sometió a ebullición por un minuto en una plancha de calentamiento, se selló la boca del Erlenmeyer con un tapón elaborado con gasa y algodón, posteriormente se llevó a esterilizar en un autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se enfrió a 25 °C y se midió su pH, el cual fue de 7,2±0,2 y se refrigeró a 4 °C. En la Figura 18, se puede observar el procedimiento de preparación realizado para este medio de cultivo.

Figura 18.

Procedimiento para la Preparación del Agua Peptonada.



Preparación de la Muestra e Inoculación de la Muestra en los Medios de Cultivos.

- **Preparación de la Muestra**

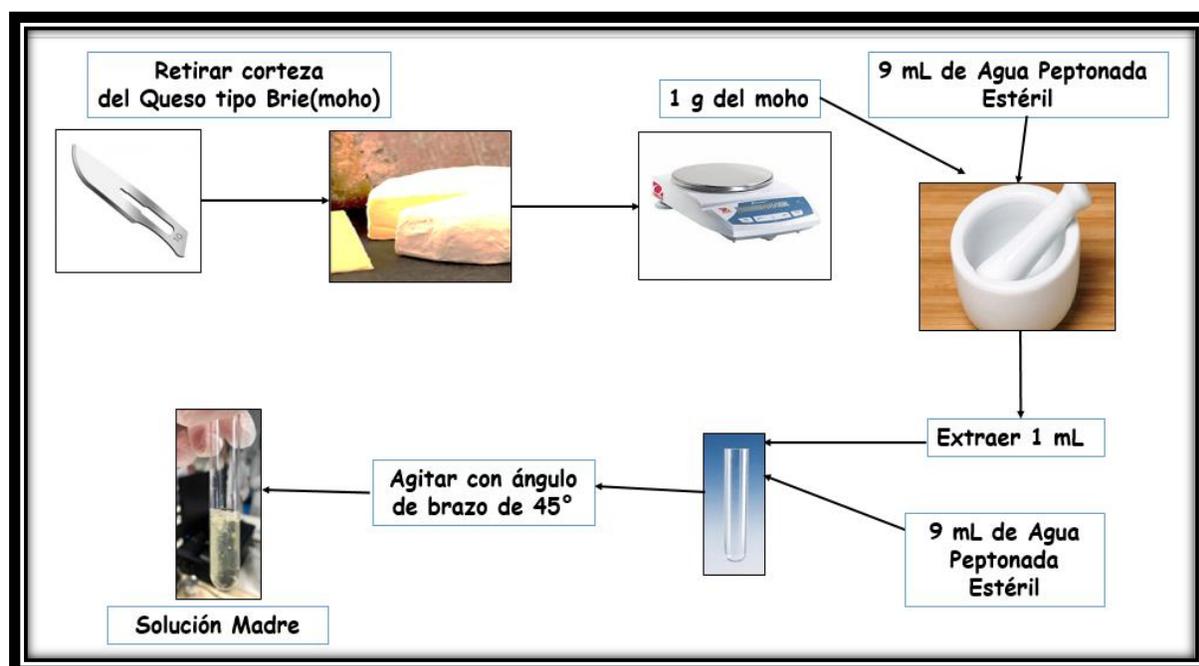
El lugar donde se preparó la muestra cumplió con las condiciones de asepsia indispensables, evitándose cualquier tipo de contaminación al abrirse el recipiente con la muestra, por ello se trabajó en la campana de Flujo Laminar, la cual fue desinfectada con alcohol al 70%,

tal como se indica en la Norma Covenin 1126-89, en esta se menciona la manera de identificar y preparar muestras para el análisis microbiológico de los Alimentos, ver Apéndice C.

Se cortó con un bisturí la corteza de la Muestra del Queso tipo Brie, que es donde se aloja principalmente el mohó *Penicillium candidum*, luego se pesó 1g del mohó en una balanza de apreciación 0,0001g, este fue depositado en un mortero y se agregó 9 mL de Agua Peptonada con una pipeta graduada estéril de 10 ml, se homogenizó la muestra, se extrajo 1 ml, el cual fue disuelto en 9 mL de Agua peptonada, contenida en un tubo de ensayo, luego se agitó unas 25 veces haciendo un ángulo de 45° con el brazo para homogenizar, resultando esta la Solución Madre. A partir de ella se prepararon las diluciones seriadas necesarias para la Siembra. En la Figura 19, se observa el procedimiento seguido para la preparación de la muestra.

Figura 19.

*Procedimiento para la Preparación de la Muestra del Mohó *Penicillium candidum*, contenida en el Queso tipo Brie, elaborado por Lácteos Santa Rosa.*



- **Diluciones Seriadas**

Una vez que se preparó la muestra y se obtuvo la Solución Madre, se procedió a preparar 4 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Covenin 1126-89, que trata de la Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológicos de Alimentos.

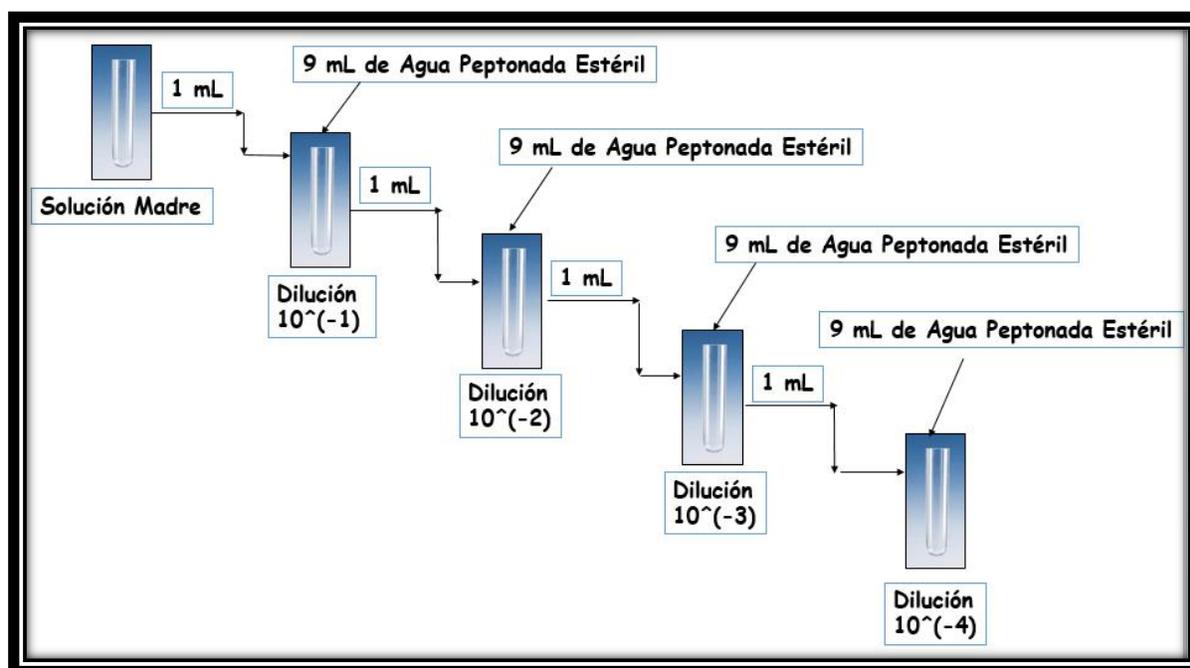
Es importante mencionar que no se dejó transcurrir más de 20 minutos desde el momento de la preparación de las diluciones hasta la inoculación de las mismas en el medio de Cultivo, tal como lo indica la norma Covenin 1337-90, la cual muestra el Método para Recuento de Mohos y Levaduras en Alimentos.

En la Figura 20, se puede observar el procedimiento empleado para la preparación de las diluciones seriadas.

www.bdigital.ula.ve

Figura 20.

Procedimiento para la Preparación de Diluciones Seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}).



- **Inoculación de la Muestra en Medios de Cultivos**

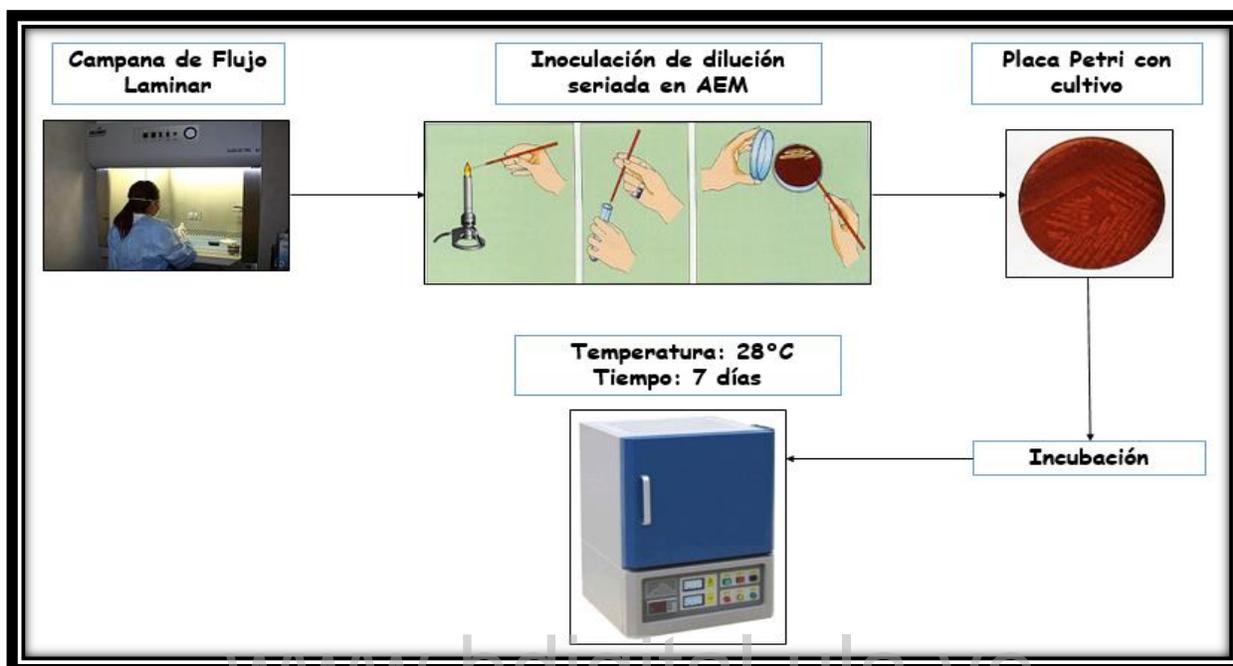
La muestra fue inoculada en los medios de cultivos empleados por López et al. (2010), Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Papa Dextrosa, (PDA), Agar Arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF).

La primera siembra o siembra primaria se realizó en el AEM, para ello, se trabajó en la campana de flujo laminar, la técnica para la siembra fue el método de estría en superficie y los instrumentos empleados fueron el mechero y asa. Se inocularon 4 placas Petri con medio de cultivo, por duplicado, en cada placa se depositó una dilución seriada.

El procedimiento de inoculación consistió en tomar una muestra de las diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , con el asa previamente esterilizada (al exponerse al rojo vivo en el mechero), se tomó la muestra de las diluciones las cuales se extendieron por toda la superficie del medio de cultivo con ayuda del asa, con cinta adhesiva se sellaron los bordes de las placas, para evitar contaminación de las mismas, al chequear su progreso durante la incubación; posteriormente las placas Petri se llevaron a incubación por 7 días a 28°C en una estufa, aumentando la humedad relativa al incorporar un recipiente con agua estéril. Este procedimiento puede observarse en la Figura 21.

Figura 21.

Inoculación de Muestra en Medio de Cultivo Agar Extracto de Malta (AEM).



Luego de cumplirse los 7 días de incubación, se seleccionó la placa con los cultivos más puros, es decir, sin crecimiento de otros microorganismos contaminantes, los cuales se detectaban al observar colonias con características macromorfológicas diferentes a las del moho *Penicillium candidum*. De dicha placa, se tomó una muestra y se llevó a cabo una siembra secundaria, en agares AEM, PDA, AA y YGF, por duplicado, empleándose la misma técnica descrita y bajo las mismas condiciones y tiempo de incubación de la primera siembra.

Posteriormente, se seleccionaron los 2 mejores medios de cultivos, para el crecimiento del moho *Penicillium candidum*, y se realizaron cada 7 días siembras o resiembras del moho en estos medios de cultivos frescos, tanto en placa como en tubo con agar inclinado, ya que, durante la caracterización morfológica, es necesario mantener el moho en las mejores condiciones posibles.

Elaboración de Laminocultivos

Los laminocultivos o microcultivos se llevaron a cabo para poder observar al microscopio toda la estructura del moho y no solo una parte de ella como ocurre con el método de disociación.

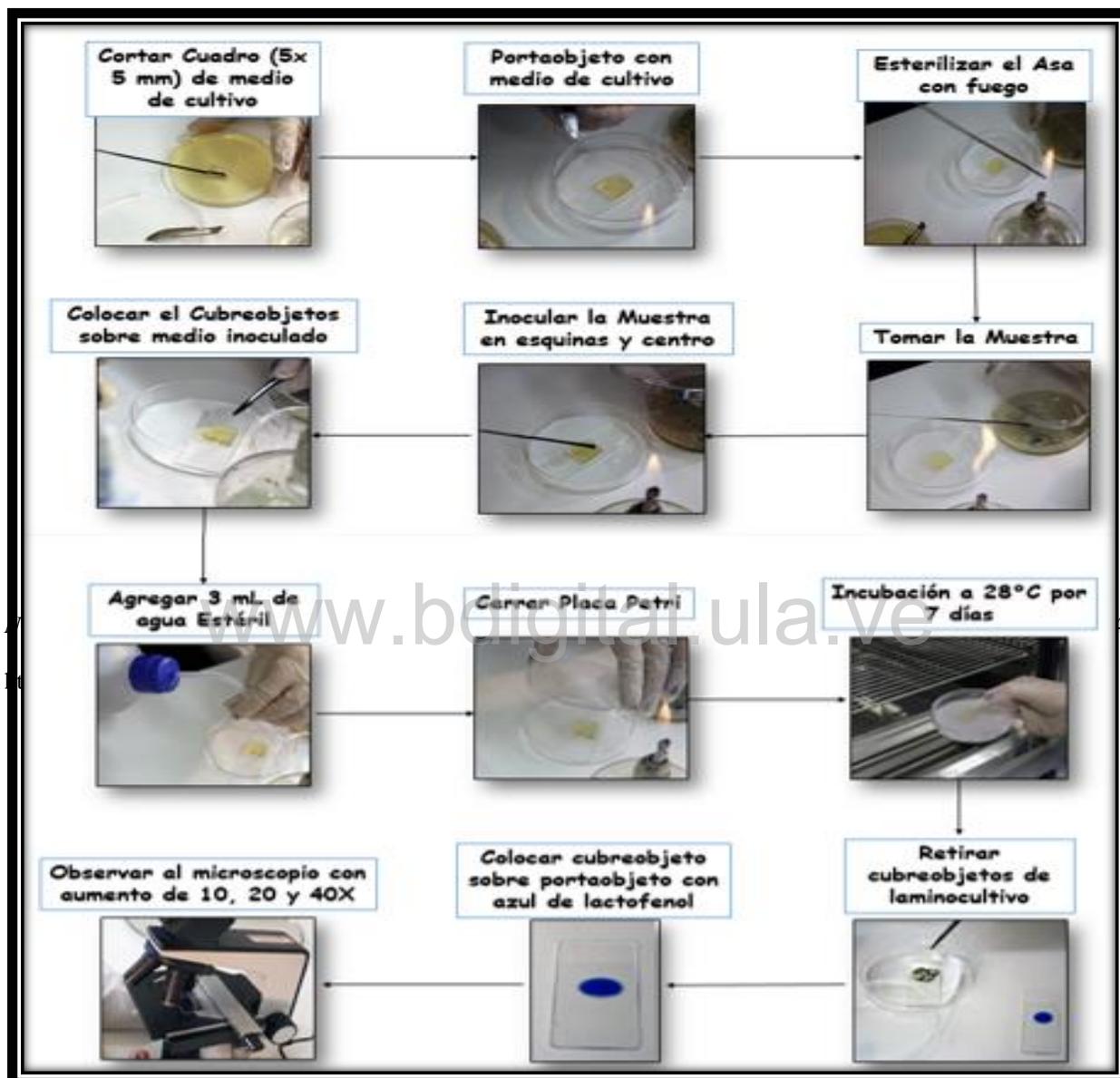
La preparación consistió en colocar un portaobjetos en el interior de una Placa Petri, con un bisturí se cortó un cuadro de 5 mm de largo y ancho de medio de cultivo fresco almacenado bajo refrigeración, (medios que corresponden a aquellos donde ocurrió un mayor crecimiento del moho *Penicillium candidum*), posteriormente se colocó dicho cuadro de medio sobre el portaobjetos; con un asa estéril, (la cual fue sometida al fuego directo hasta verse al rojo vivo), se tomó una muestra del moho que se encontraba cultivado en los dos mejores medios y se colocó en los bordes y el centro del cuadro de agar, que estaba sobre el portaobjetos. Luego se colocó el cubreobjetos sobre el cuadro de agar inoculado. Se vertió unos 3 ml de agua estéril, por el borde de la placa Petri, para proporcionar una adecuada humedad y evitar que se desecara el medio de cultivo durante la incubación, la cual se llevó a cabo a una temperatura de 28°C por 7 días. Estos se realizaron por triplicado.

Para la observación de los laminocultivos al microscopio se retiró el cubreobjetos con una pinza estéril y se colocó sobre un nuevo portaobjetos, esta laminilla, se observó al microscopio utilizando el objetivo de 10 aumentos para enfocar y tener una imagen general de todo el campo. Posteriormente se enfocó con los objetivos de 20 y 40 aumentos para estudiar y observar mejor las estructuras microscópicas para su identificación.

En la Figura 22, se puede observar las diferentes etapas de elaboración de los laminocultivos.

Figura 22.

Etapas para la elaboración de Laminocultivos.



Caracterización Morfológica

La Caracterización Morfológica, se realizó tanto macroscópica como microscópicamente, siguiendo la metodología empleada por López et al. (2010).

- **Caracterización Macroscópica**

Para la Caracterización Macroscópica, se tomaron los cultivos desarrollados en las placas Petri luego de su periodo de incubación y se observó la forma de la colonia, el color anverso y reverso de las mismas, la textura del moho, la producción de pigmento difusible al medio de cultivo y producción de exudado.

- **Caracterización Microscópica**

La caracterización microscópica, se llevó a cabo observando al microscopio los laminocultivos, en los cuales se visualizó la estructura vegetativa del moho es decir el micelio, el cual está compuesto por hifas que pueden ser septadas o cenocítica y se observó el entrelazamiento y unión que presentan; también se observó la estructura reproductiva, en otras palabras, la producción de conidios, que corresponden a la reproducción asexual y la producción de ascosporas que indica reproducción sexual. En esta caracterización se visualizó la forma del flagelo, el tipo de conidióforo, la forma de fíales y de los conidios formados.

Almacenamiento y Conservación del Moho *Penicillium candidum* Aislado

El método de almacenamiento que se empleó para conservar el moho *Penicillium candidum*, durante el aislamiento y caracterización morfológica, corresponde a tubo con agar inclinado, el cual es una técnica de preservación a corto plazo, que va de 1 semana a 2 meses, por lo cual el medio de cultivo en el que se conservó, tuvo que ser cambiado periódicamente, manteniéndolo a una temperatura de 4°C, para brindar las mejores condiciones posibles al moho, poder garantizar su actividad y viabilidad al momento de emplearlo.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo IV

Resultados y Discusiones

Previamente a la toma de muestra de Queso Tipo Brie, se observó la elaboración de este en lácteos Santa Rosa, y se monitoreó el crecimiento del moho *Penicillium candidum* en las cavas de maduración, las cuales mantuvieron una temperatura de 18°C y una Humedad relativa de 84%, lo cual está dentro de los rangos establecido por Borregales (s.f), en cuanto a las condiciones en la cava de maduración, ya que indica que la temperatura debe oscilar entre 16 y 18°C, mientras que la humedad relativa debe estar entre 80 y 85%.

Así mismo, al 8vo día de maduración se tomó la muestra en cuestión, como se observa en la Figura 23, 24 y 25.

Figura 23.

Queso Tipo Brie al Octavo día de maduración en Cavas de Lácteos Santa Rosa, previo a la toma de muestra.



Figura 24.

Queso Tipo Brie al Octavo día de maduración en Cavas de Lácteos Santa Rosa, luego de la toma de muestra.

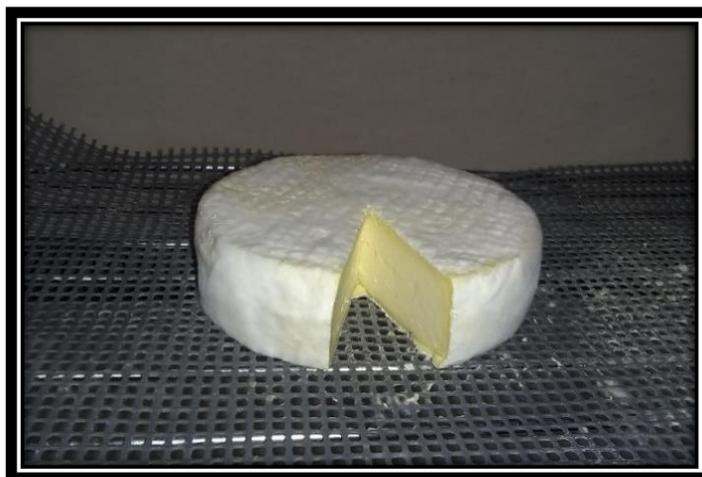


Figura 25.

www.bdigital.ula.ve

*Muestra del Queso Tipo Brie, Elaborado por lácteos Santa Rosa, para el Aislamiento del *Penicillium candidum**



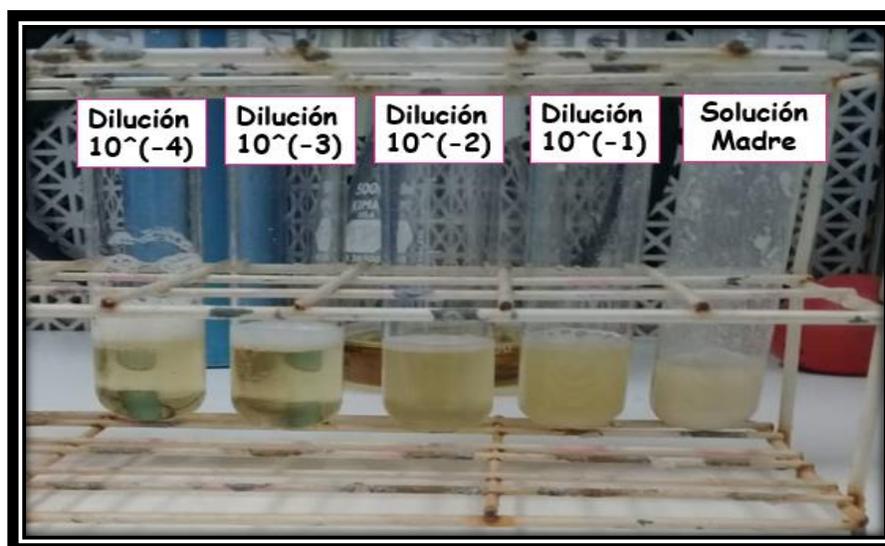
Como se observan en las figuras 23, 24 y 25, el queso Brie, está cubierto por una capa relativamente uniforme de color blanco, con una textura aterciopelada, indicando la presencia y crecimiento del moho *Penicillium candidum*, como lo muestra Borregales (s.f), acerca de las características que adquiere el queso Brie, por acción de las enzimas de este moho, durante la maduración. Sin embargo, la falta de uniformidad de esta capa, indica que los 8 días de maduración no son suficientes para lograr que el moho actúe sobre todo el Queso Tipo Brie y le otorgue sus características organolépticas.

De la muestra tomada se extrajo 1,0047g de corteza del queso, ya que en esta se aloja la mayor cantidad del moho. Siguiendo la metodología descrita, se prepararon 4 diluciones seriadas, las cuales corresponden a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} a partir de la solución madre, como se observa en la Figura 26.

www.bdigital.ula.ve

Figura 26.

Diluciones Seriadas del Moho Penicillium candidum extraído del Queso tipo Brie, elaborado por Lácteos Santa Rosa.



Los medios de Cultivos empleados fueron Agar Extracto de Malta (AEM) Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF); los cuales fueron elaborados y almacenados bajo refrigeración a 4 °C, como se observa en la Figura 27

Figura 27.

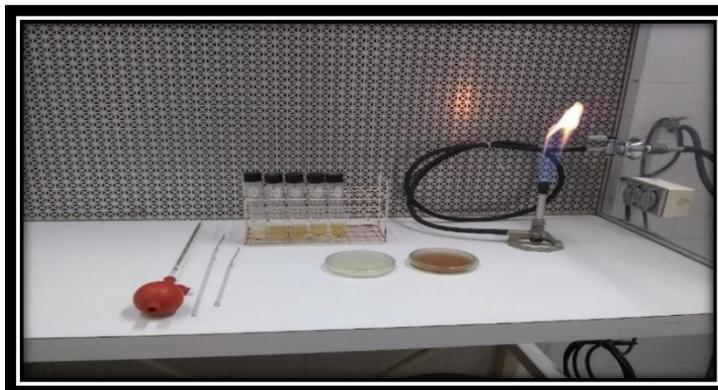
Medios de Cultivo, Agar Extracto de Malta (AEM) Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF); refrigerados a 4°C.



La siembra de las diluciones seriadas del moho, corresponde a la primera siembra, la cual, se realizó por duplicado, se llevó a cabo en la campana de Flujo laminar, como se observa en la Figura 28, empleando el medio de cultivo AEM, bajo el método de siembra de estría en superficie.

Figura 28.

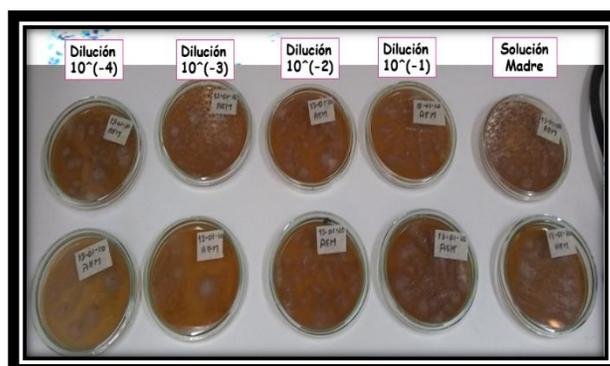
*Siembra del Moho *Penicillium candidum* en Campana de Flujo Laminar*



Luego de 7 días de incubación a 28°C, se observó el crecimiento de algunas colonias del Moho *Penicillium candidum*, indicando que el mismo es eficiente para el aislamiento del moho, como lo sugiere López et al. (2010), esto se debe, a que contiene tanto dextrosa como glicerina, las cuales funcionan como fuente de carbono, además que este medio de cultivo está diseñado para la propagación de Hongos y levaduras. En la Figura 29, se puede observar el crecimiento del moho en el medio de cultivo AEM.

Figura 29.

*Crecimiento del Moho *Penicillium candidum* en el medio de Cultivo Agar Extracto de Malta (AEM). Primera Siembra.*



Una vez obtenidas las primeras colonias del moho, se realizó la segunda siembra, la cual se llevó a cabo en los medios de cultivo, AEM, PDA, AA y YGF, por duplicado siguiendo metodología, descrita por López et al. (2010), ya que estos medios tienen en común la disposición de glucosa, la cual es importante para el crecimiento en biomasa del moho. Si esta se encuentra disponible directamente o no, como en el AA, el moho cuenta con las enzimas necesarias, para degradar en este medio el almidón y poder obtener la glucosa de las cadenas de amilosa y amilopectina. En la Figura 30, se observa el cultivo, luego del primer día de incubación.

Figura 30.

*Siembra del moho *Penicillium candidum* Aislado en Medios de Cultivo: Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Arroz al 20% (AA) y Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF). Segunda Siembra. Crecimiento luego de 1 día de Incubación.*



Esta siembra, se cultivó en las mismas condiciones que la primera, a una temperatura de 28°C, por 7 días, Esta temperatura fue establecida, ya que la temperatura recomendada para el crecimiento del moho está en un rango de 20 a 30°C, y debido a que, el laboratorio no cuenta con

un sistema controlado de temperatura, ocurre un descenso de algunos grados en las noches, por lo cual, esta fue la manera de controlar las variaciones climáticas, que pueden modificar las condiciones de incubación. Además, como el moho es aeróbico y requiere una alta humedad para su crecimiento, en la estufa durante la incubación se incorporó un vaso de precipitado de 500 ml de capacidad, con agua estéril, como se observa en la Figura 31.

Figura 31.

*Incubación del moho *Penicillium candidum* en Medios de Cultivos: Agar Extracto de Malta (AEM), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Arroz al 20% (AA), Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF); con Incremento de Humedad Relativa, al Incorporar Agua estéril en Vaso de Precipitado.*



Al pasar los 7 días de incubación, se observó un mayor crecimiento del moho en los medios de cultivo PDA y YGF, y aunque el PDA no es un medio de cultivo selectivo para hongos como

el YGF, al reducir su pH con ácido tartárico al 10%, se inhibe el crecimiento de especies de microorganismo no deseadas y se promueve el crecimiento del *Penicillium candidum*

Estos dos medios tienen en común la adición de dextrosa o glucosa durante su elaboración a diferencia de AEM y AA, en el primero se trabaja con un medio deshidratado y en el segundo, la glucosa disponible que tiene el moho está en las cadenas que contiene la amilosa y amilopectina del almidón. Lo que demuestra que el moho es capaz de realizar un crecimiento de biomasa y producción de conidios en medios con glucosa.

En las figuras 32 y 33, se puede observar el crecimiento del moho en PDA y YGF, luego de los 7 días de incubación

Figura 32.

Cultivo del Moho *Penicillium candidum* en Agar Papa Dextrosa (PDA), luego de 7 días de incubación.



Figura 33.

Cultivo del Moho Penicillium candidum en Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF), luego de 7 días de incubación.



Posteriormente se realizó una tercera siembra solo en los mejores medios de cultivo los cuales fueron PDA y YGF, ya que brindaron una nutrición eficiente para el crecimiento del moho en estudio. La siembra se hizo tanto en placa como en tubo con agar inclinado, esto debido a que en tubos se puede proteger de manera más eficiente de contaminaciones durante la siembra y manipulación en estufa, al monitorear crecimiento del moho. Además, luego de su tiempo de incubación, estos fueron refrigerados a 4°C, ya que este es un método de almacenamiento a corto plazo. Las placas cultivadas, se sembraron en punto central, no se empleó el método de estría,

debido a que fue necesario estudiar el crecimiento de la colonia del moho *Penicillium candidum* para la caracterización macromorfológica.

Así mismo, fue requerida la elaboración de Laminocultivos, para la caracterización micromorfológica del moho, en la cual se mantuvo constante durante la incubación, la temperatura y tiempo, es decir, 28°C y 7 días, respectivamente. En la Figura 34 y 35 se puede observar la elaboración de los laminocultivos.

Figura 34.

Laminocultivo del moho Penicillium candidum, realizado con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

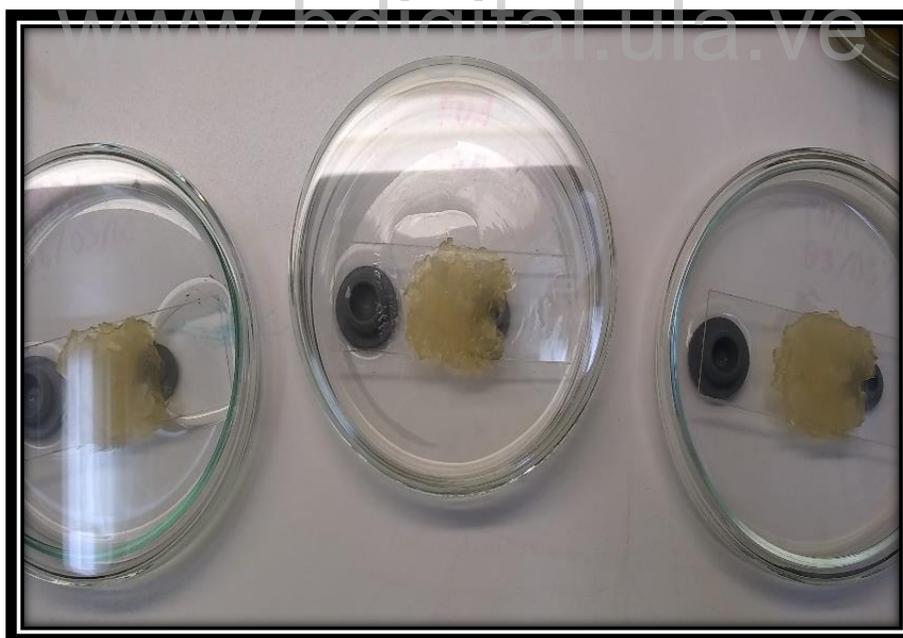


Figura 35.

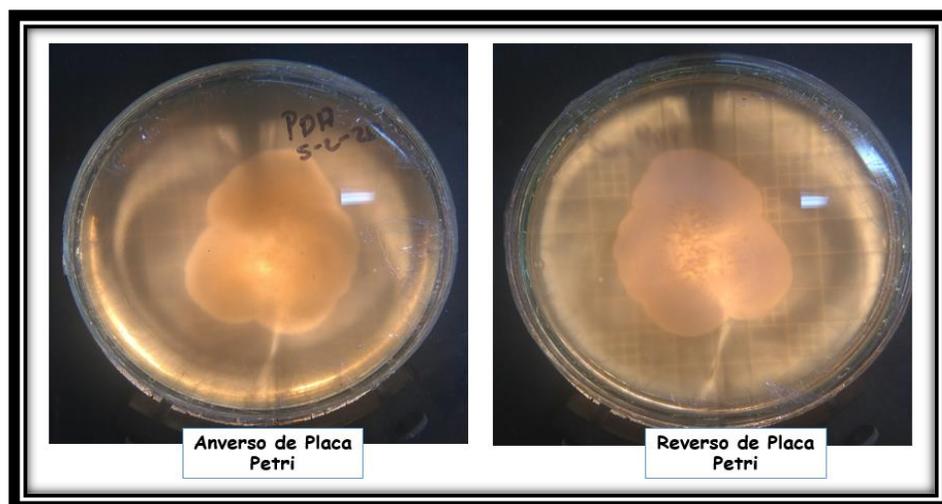
Laminocultivo del moho Penicillium candidum, realizado con medio de cultivo Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF).



Una vez obtenida, la siembra del Moho en Punto Central de Placas con Medios de Cultivo PDA y YGF, se procedió a caracterizar la morfología macroscópica del moho, observando que la colonia del moho tanto anversa como reserva fue de color blanco, de textura aterciopelada, sin producir pigmento difusible y tuvieron producción de exudado; características que coinciden en el moho cultivado en PDA y YGF, como se muestra en las Figuras 36 y 37.

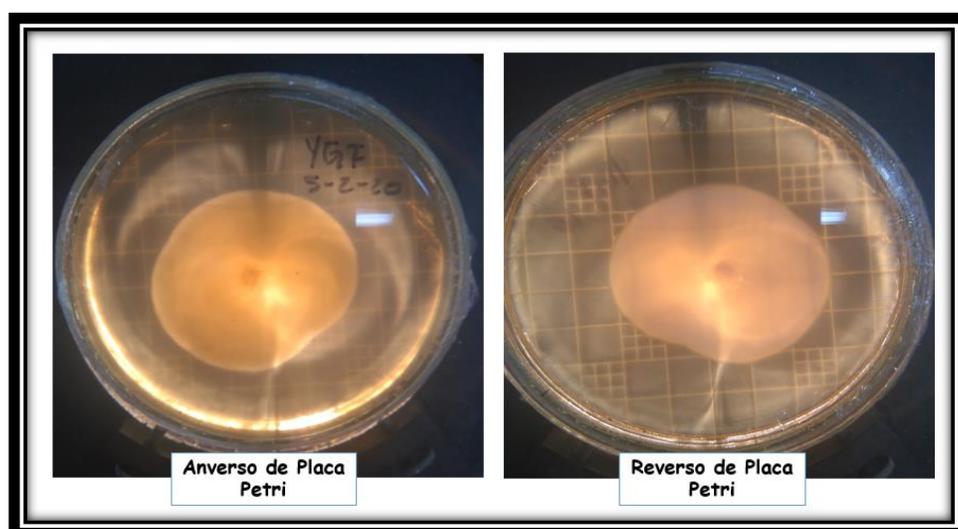
Figura 36.

Observación de Características Macromorfológicas del Moho Penicillium candidum en Medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), luego de 7 días de Incubación.

**Figura 37.**

www.bdigital.ula.ve

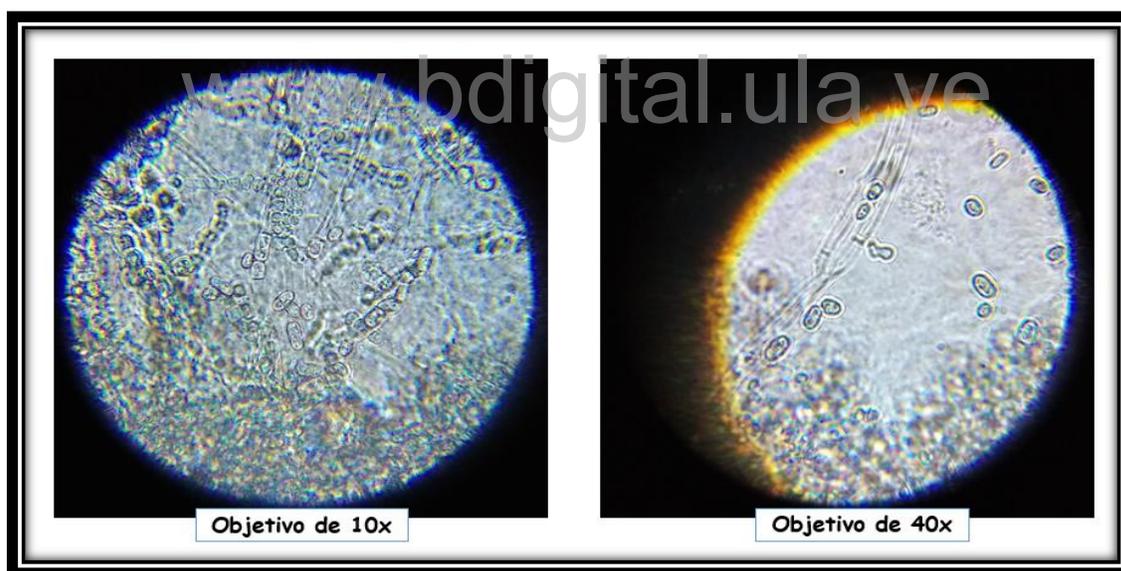
Observación de Características Macromorfológicas del Moho Penicillium candidum en Medio de Cultivo Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF), luego de 7 días de Incubación.



Luego de los 7 días de incubación de los laminocultivos, siguiendo la metodología descrita, se observó al microscopio el crecimiento del moho, para realizar la caracterización morfológica microscópica, empleando objetivos de 10 aumentos para observar todo el campo y de 40 aumentos para observar mejor las estructuras del moho, encontrando que este estaba en la primera fase de crecimiento, es decir, formando su estructura o cuerpo vegetativo, el cual está constituido por el micelio, que a su vez contiene hifas que se encuentran entrelazadas y se mostraron segmentadas como se observa en la Figura 38.

Figura 38.

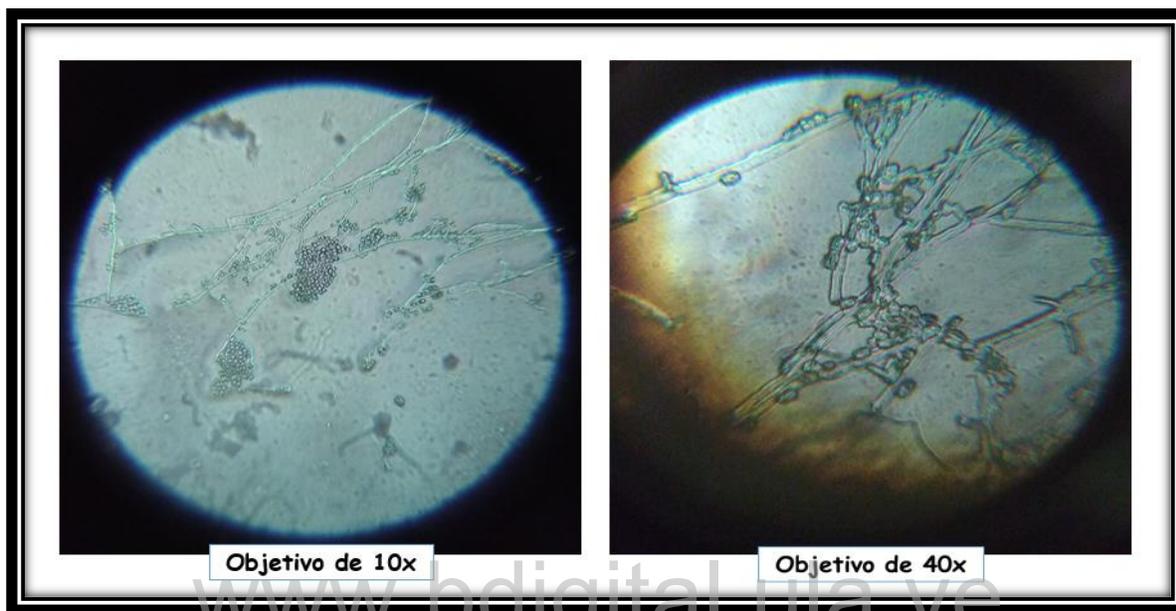
*Observación de Características Micromorfológicas del Moho *Penicillium candidum* Aislado a los 7 días de Incubación, Observados con el Microscopio utilizando objetivos de 10 y 40 aumentos*



En vista de que en un periodo de incubación de 7 días, no se logró desarrollar la estructura vegetativa y reproductiva del moho, se procedió a aumentar el tiempo de incubación a las mismas condiciones de humedad y temperatura, observando a los 8 días de incubación un aumento de hifas y por tanto del micelio, como se muestra en la Figura 39.

Figura 39.

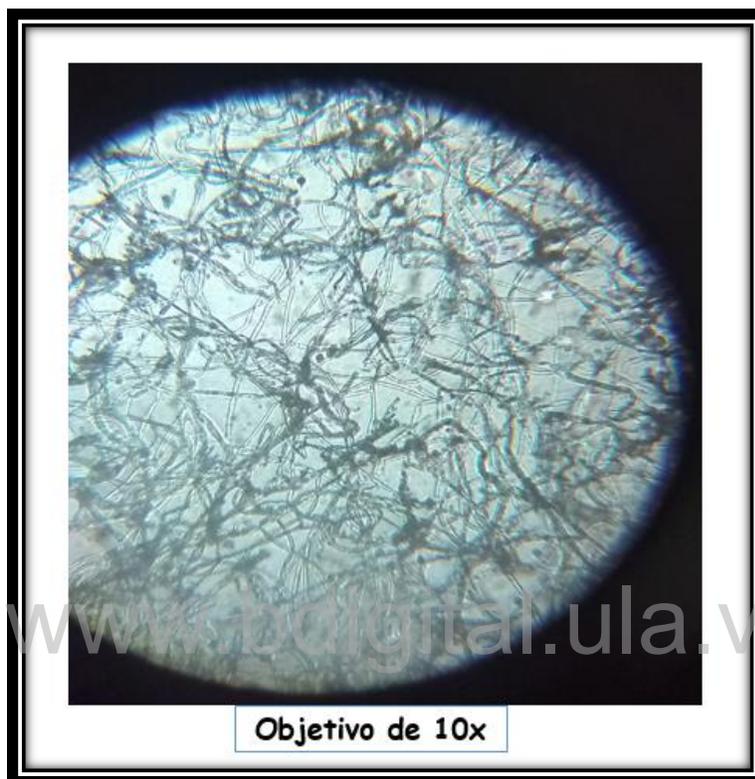
Observación de Características Micromorfológicas del Moho Penicillium candidum Aislado a los 8 días de Incubación, Observados con el Microscopio utilizando objetivos de 10 y 40 aumentos



Posteriormente se estudió el crecimiento del moho a los 10 días de incubación observando un aumento significativo del cuerpo vegetativo, lo que implica que el moho se encuentra en el inicio de la segunda fase de crecimiento, es decir en la fase exponencial, como lo muestra Lessard et al. (2012), la cual ocurre en las extremidades de las hifas y las células contenidas en los septos de las mismas aportan nutrientes a las células periféricas, las cuales requieren carbohidratos, nitrógeno y fosfatos para su crecimiento. En la Figura 40, se muestra el crecimiento descrito.

Figura 40.

Observación de Características Micromorfológicas del Moho Penicillium candidum Aislado a los 10 días de Incubación, Observados con el Microscopio utilizando el objetivo de 10 aumentos

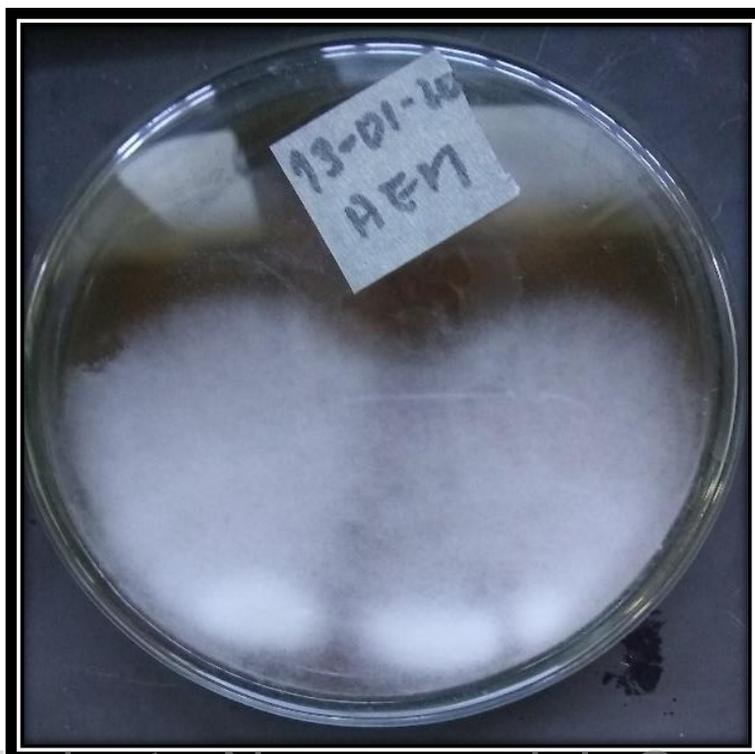


Los resultados obtenidos hasta el día 10 de incubación del moho, indican que es necesario hacer ajustes de tiempo de incubación para permitir que se lleve a la cabo la segunda fase de crecimiento, ya que al final de esta aparece el cuerpo reproductivo, es decir conidios y ascosporas, que corresponden a la reproducción asexual y sexual respectivamente, debido a que este moho presenta los dos tipos de reproducciones. Tal como lo sugiere López et al. (2010), al aumentar el tiempo de incubación del moho en el sustrato, aumenta el recuento del mismo, el cual al encontrarse en un número adecuado, beneficia la elaboración del queso tipo Brie, ya que durante la maduración su sistema de enzimas aportan sabor, color, textura al mismo.

Cabe resaltar que algunas placas pertenecientes a los primeros cultivos, fueron preservadas a condiciones ambientales, para observar el crecimiento del moho a través del tiempo; resultando que las Placas cultivadas en la Siembra Primaria, es decir, los cultivos obtenidos en AEM, las cuales fueron expuestas a variaciones en las condiciones de incubación luego de los 7 días, ya que las mismas se sometieron a la una temperatura y humedad relativa ambientales, es decir, a las del laboratorio, que en promedio es de 18°C y 80,5% respectivamente, y luego de 6 semanas se observó que el crecimiento del moho en las placas fue exitoso, presentando características macromorfológicas representativas de este moho como el crecimiento de colonias blancas, aterciopeladas, sin producción de pigmento difusible, como se observa en la Figura 41.

Figura 41.

*Observación de Características Macromorfológicas del Moho *Penicillium candidum* en Medio de Cultivo Agar Extracto de malta (AEM), luego de 6 semanas a 18°C y una Humedad Relativa de 80,5%*



Además, se llevó a cabo el análisis de las características micromorfológicas del moho luego de 6 semanas, empleando la técnica de cinta adhesiva transparente, observando características micromorfológicas propias del moho *Penicillium candidum* como un micelio con hifas septadas, con entrelazamiento que forma un tejido pseudoparenquimatoso, correspondiente a la estructura vegetativa. Mientras que, en la estructura reproductiva, se logró apreciar un conidióforo terverticilado, con fialides en forma de botella, conidios esféricos, acrógenos y un flagelo en forma de cepillo o pincel, es decir, se logró observar su estado anamorfo, imperfecto o asexual. Y al compararlo con Claves taxonómicas, indican que en efecto el moho corresponde al *Penicillium candidum*, como se observa en las figuras 42 y 43.

Figura 42.

Observación de Características Micromorfológicas del Moho Penicillium candidum, luego de 6 semanas, condicionado a 18°C y una Humedad Relativa de 80,5%, Observados con el Microscopio utilizando objetivos de 10 y 40 aumentos

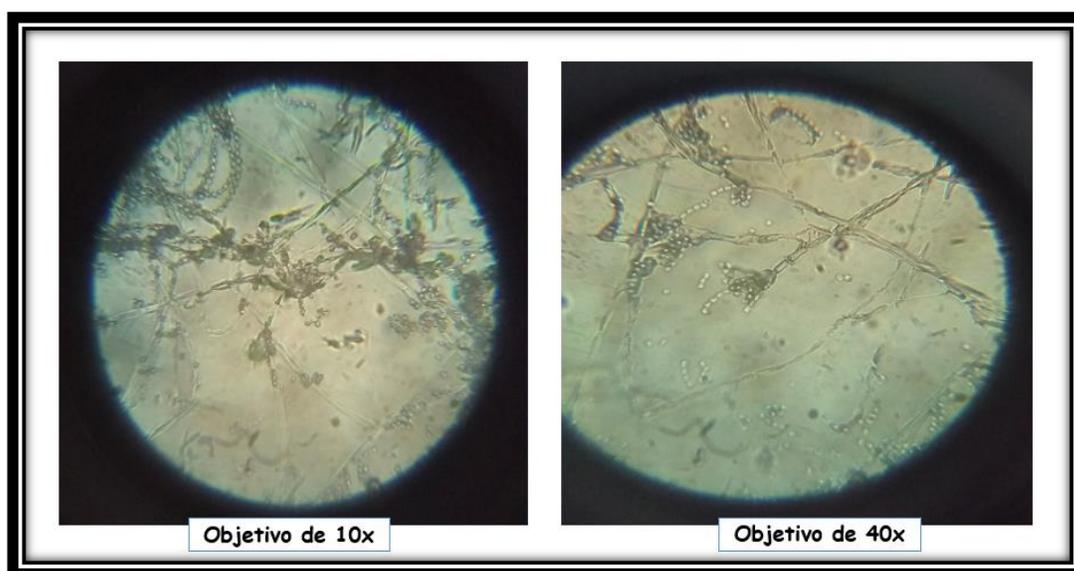
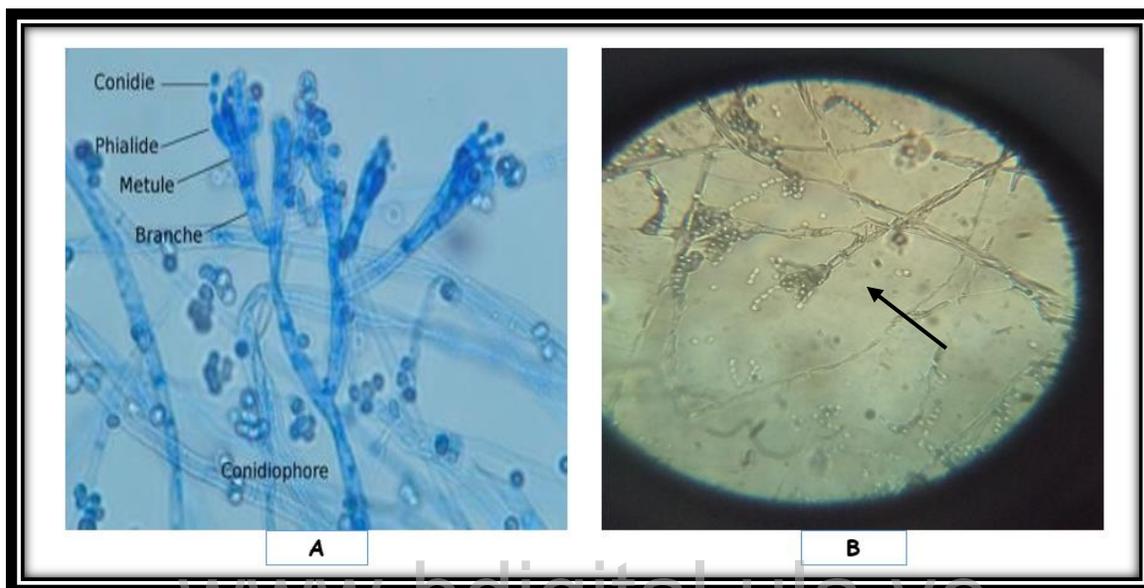


Figura 43.

Morfología Microscópica del Moho Penicillium candidum. A: Imagen Real, B: Observado luego de 6 semanas, condicionado a 18°C y una Humedad Relativa de 80,5%.



Nota. A: Imagen Real, adaptada de *Penicillium camemberti*, Garge, 2020, <https://alchetron.com/Penicillium-camemberti>.

El parecido es evidente, aunque la estructura reproductiva, especialmente las conidias se observaron rotas, a causa de la técnica empleada para la visualización al microscopio.

Los resultados obtenidos sugieren que al exponer el moho a temperaturas más bajas, humedades más altas y prolongar el tiempo de incubación, se puede obtener el Moho *Penicillium candidum* Aislado a partir del Queso tipo Brie, ya que al modificar estas variables, en especial el tiempo, se logran cumplir los periodos de crecimiento del moho que involucran el desarrollo del cuerpo vegetativo o micelio, la reproducción asexual o conidios y la reproducción sexual o ascosporas, que corresponden a la tercera fase en la que el peso del micelio disminuye debido al agotamiento de la glucosa, lo que desencadena estrés y genera la esporulación.

Por otro lado, la variable de nutrientes, no se sugiere que cambie, ya que al realizar la segunda siembra y comparar el crecimiento del moho en diferentes medios de cultivos, el crecimiento mayor ocurrió en PDA y YGF en comparación con el AEM y AA. Por ello se presume que, al someter el moho a las condiciones de temperatura, humedad y tiempo descritas anteriormente, puede obtenerse la estructura reproductiva del *Penicillium candidum* en PDA y YGF.

En cuanto al almacenamiento del moho, se observó que, empleando el método de tubo con agar inclinado, la conservación fue exitosa a corto plazo, es decir, por un tiempo de aproximadamente 2 meses.

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones.

- La observación macroscópica, de las placas cultivadas en Agar Papa Dextrosa (PDA) y Extracto de levadura, glucosa, florfenicol (YGF), arrojaron características macromorfológicas con rasgos distintivos del *Penicillium candidum*, como colonias blancas, aterciopeladas, que no producen pigmento difusible, pero sí exudado.
- El PDA y YGF, ofrecen un sustrato favorable, para el crecimiento del Moho; sin embargo, al llevarlo a incubación por 7 días a 28°C, no fue suficiente para culminar las fases de crecimiento de este moho, ya que, en la caracterización micromorfológica, solo se observó desarrollo del cuerpo vegetativo.
- El Agar Extracto de Malta (AEM), es un medio de cultivo que permitió obtener el moho *Penicillium candidum*, luego de ser sometido durante 6 semanas, a una Temperatura de 18°C y una Humedad relativa de 80,5%, ya que, en la Caracterización Morfológica se mostró crecimiento del cuerpo vegetativo y reproductivo del moho.
- Al modificar el tiempo de incubación a 6 semanas, bajar la temperatura a 18°C e incrementar la humedad relativa a 80,5%, se logró obtener un crecimiento considerable del moho, el cual fue visible macroscópicamente y microscópicamente se mostraron características que lo identifican como *Penicillium candidum*.
- El almacenamiento del moho aislado, empleando la técnica de tubo con agar inclinado, es un método de conservación eficiente para ser empleado a corto plazo.

Recomendaciones.

- Considerar llevar a cabo, la incubación del moho *Penicillium candidum* en los medios de cultivos de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y Extracto de Levadura, Glucosa, Florfenicol (YGF), a las condiciones de Temperatura 18°C y Humedad relativa 80,5% por 6 semanas, con el fin de observar si luego de este tiempo, ocurre un crecimiento tanto del cuerpo vegetativo como reproductivo del moho.
- Se sugiere, llevar a cabo la Caracterización Fisiológica del *Penicillium candidum* Aislado, mediante el peso seco del micelio y la enumeración de hongos; además del Estudio de la Capacidad Proteolítica y Lipolítica, que posee el mismo, a través del índice de potencia, ya que estos análisis no se lograron realizar por inconvenientes técnicos.
- Si se desea almacenar por mucho tiempo, las cepas aisladas, se sugiere la implementación de un método de conservación a largo plazo, como la Técnica de Suspensión en Agua Destilada Estéril, Conservación en Capa de Aceite Mineral, Dsecación en Sílica Gel o Conservación del moho en Suelo Estéril; ya que estos métodos serian rentables por su bajo costo y podrían ser viables industrialmente.

Referencias.

Anonymous. (05 de octubre de 2014). Laminocultivo. *Para técnicos de Laboratorio*.

<http://paratecnicosdelaboratorio.blogspot.com/2014/10/laminocultivo.html>.

Arias, E. y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de Suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde*. [Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana].

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Borregales, C. (s.f). *Algunas Variedades de Quesos en el Mundo*. Productora de Alimentos Universitaria (P.A.U), Lácteos Santa Rosa A.C.

Comisión del Codex Alimentarius, Leche y Productos Lácteos. (2011). *Norma del Codex para el Brie. Codex Stan 277- 1973*. <http://www.fao.org/3/i2085s/i2085s.pdf>

Comisión Venezolana de Normas Industriales, Covenin 938. (09 de agosto de 1983). *Leche Y Productos Lácteos. Métodos para la toma de Muestra*. Ministerio del Poder Popular de Planificación. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/938-83.pdf>

Comisión Venezolana de Normas Industriales, Covenin 1126. (07 de junio de 1989). *Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico*. Ministerio del Poder Popular de Planificación. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1126-89.pdf>

Comisión Venezolana de Normas Industriales, Covenin 1337. (01 de agosto de 1990). *Alimentos. Método para Recuento de Mohos y Levaduras*. Ministerio del Poder Popular de Planificación. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1337-1990.pdf>

Comisión Venezolana de Normas Industriales, Covenin 2850. (09 de diciembre de 1992). *Queso Brie*. Ministerio del Poder Popular de Planificación. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2850-92.pdf>

Condalab. (14 de junio de 2019). *Agar Cloranfenicol (Agar YGC) ISO*. https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1075-11035-agar-cloranfenicol-agar-ygc-iso.html#/2-formato-500_g

El queso Brie. Nota de cata y características. (11 de julio de 2012). <https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-queso-brie-nota-de-cata-y-caracteristicas/amp>

Escardino, A. (s.f). *Estudio Morfológico y Fisiológico (hongos filamentosos)*.

[https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/caracterizacion-eucariotas/estudio-morfologico-fisiologico-hongos-filamentosos-](https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/caracterizacion-eucariotas/estudio-morfologico-fisiologico-hongos-filamentosos-1285978915995.html#:~:text=Crecimiento%20y%20aspecto%20en%20diferentes,con%20altas%20concentraciones%20de%20glucosa.)

[1285978915995.html#:~:text=Crecimiento%20y%20aspecto%20en%20diferentes,con%20altas%20concentraciones%20de%20glucosa.](https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/caracterizacion-eucariotas/estudio-morfologico-fisiologico-hongos-filamentosos-1285978915995.html#:~:text=Crecimiento%20y%20aspecto%20en%20diferentes,con%20altas%20concentraciones%20de%20glucosa.)

Garcés, A., Saravia, K. (2008). *Trabajo Practico N°6. Preparación de Medios de Cultivo*.

http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparacion%20de%20medios%20de%20cultivo.pdf.

www.bdigital.ula.ve

Garge, S. (21 de febrero de 2020). *Penicillium camemberti*. <https://alchetron.com/Penicillium-camemberti>.

Gil, M (s.f.-a). *Agar Papa Dextrosa: Fundamento, Preparación y uso*.

<https://www.lifeder.com/agar-papa-dextrosa/>.

Gil, M (s.f.-b). *Agua Peptonada: Fundamento, Preparación y usos*. <https://www.lifeder.com/agua-peptonada/>.

Godínez, S. y Calderón, M. (2008). Influencia del Tiempo de Conservación por Liofilización en Cepas del Genero *Penicillium* de Utilidad en la Industria Alimenticia. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18 (1), 66-70. <http://hdl.handle.net/1834/4842>

Gómez, V. (s.f). *Penicillium: Características, Taxonomía, Morfología, Hábitat*.
<https://www.lifeder.com/penicillium/>.

Grisales, L. (30 de marzo de 2017). *Hongos (Reino fungí) características y Clasificación o Tipos*.
<https://naturaleza.paradais-sphynx.com/fungi/hongos.htm> .

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (15 de febrero de 2016). *Penicillium spp*.
<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>

Jiménez, A. (Enero de 2013). Métodos de Siembra. *Microbiología Paso a Paso*.
<http://microbiologiauasd.blogspot.com/p/metodos-de-siembra.html>.

Leclercq, M., Picque, D., Campo, S., Monnet, C. (2013). Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *Journal of Dairy Science*, 96 (6), 4031-4040.
<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6372>

Lessard, M; Belanger, G; St-Gelais, D y Labrie, S (2012). The Composition of Camembert Cheese-Ripening Cultures Modulates both Mycelial Growth and Appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (6), 1813-1819.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298135/>.

López, D., Jiménez, M., López, A. (2010). *Identificación de hongos benéficos que participan en el proceso de Obtención del Queso Paipa en lácteos Ibel, Municipio de Belén (Boyacá)*. [Trabajo de Grado, Universidad de la Salle].
https://www.researchgate.net/publication/277108006_IDENTIFICACION_DE_HONGO_S_BENEFICOS_QUE_PARTICIPAN_EN_EL_PROCESO_DE_OBTENCION_DEL_QUESO_PAIPA_EN_LACTEOS_IBEL_MUNICIPIO_DE_BELEN_BOYACA

www.bdigital.ula.ve

Macalupú, S; Ausejo, F; Navarro, A. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. <https://docer.com.ar/doc/x55001>.

Maldonado, S; Mondaca, I; Caro, R; Gámez, L; De Los Santos, S; Meza, M; Balderas, J. (2017). Selección de cepas productoras de enzimas ligninolíticas nativas del Valle del Yaqui. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 9 (2), 24-36
<http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v9n19/2007-0705-ns-9-19-00024.pdf>

Ojeda, N (21 de marzo de 2018). *¿Qué son las características organolépticas de los alimentos?*

<https://www.ceac.es/blog/que-son-las-caracteristicas-organolepticas-de-los-alimentos>.

Reinos de la Naturaleza. (24 de marzo de 2020). Significados. Recuperado el 15 de enero de 2021

de <https://www.significados.com/reinos-de-la-naturaleza/>

Sacristán, N. (2015). *Selección de Cepas de Geotrichum candidum Aisladas de Quesos*

Artesanales con vistas a la Obtención de Co-Cultivos de Interés Tecnológico para la

Elaboración de Quesos. [Tesis Doctoral. Universidad de León].

<https://buleria.unileon.es/handle/10612/5975>

www.bdigital.ula.ve

Subero, L. (s.f). *Los Hongos: Su Morfología, Reproducción y Fisiología*.

<https://es.scribd.com/document/51499039/6-Los-hongos-morfologia-reproduccion>.

Visagie, C., Houbraeken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., Perrone, G., Seifert, K., Varga, J.,

Yaguchi, T., Sansón, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*.

Journal Studies in Mycology, 78, 343-371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

Apéndice

Apéndice A

Covenin 1337-90. Alimentos. Método para el recuento de Mohos y Levaduras.

8.5 Finalizado el período de incubación se seleccionan preferentemente las placas donde aparezcan entre 10 y 100 colonias. Con la ayuda de un cuenta colonias o en su defecto, una lente de aumento, se cuentan todas las colonias de mohos y levaduras por separado y se anota la dilución correspondiente. Si el número de mohos y levaduras es demasiado elevado o si se trata de mohos de crecimiento rápido, debe hacerse el recuento al tercer día y repetirlo al quinto día. Debe evitarse contar como colonias, partículas de muestra, pequeñas burbujas u otros.

8.5.1 Si las placas de todas las diluciones tienen más de 100 colonias, se seleccionan aquellas que tengan el valor más cercano a 100.

8.5.2 Si las placas de todas las diluciones tienen menos de 10 colonias, se seleccionan aquellas que tengan el valor más cercano a 10.

8.5.3 El número de colonias promedio de las dos placas de una misma dilución se multiplica por la dilución correspondiente reportándose por separado mohos y levaduras.

8.5.4 Si placas de dos diluciones decimales consecutivas presentan entre 10 y 100 colonias se multiplica cada recuento por la dilución correspondiente, se establece el promedio y éste será el resultado final. Si el recuento más alto es superior a dos veces el más bajo, se descarta y se toma como resultado el valor más bajo.

9 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

9.1 Los resultados se expresan como recuento estándar por gramo o mililitro de muestra.

9.2 El número de colonias obtenido según 8.5.1 y 8.5.2 se multiplica por la dilución correspondiente y se expresa como "Estimado del recuento estándar".

9.3 Si no hay colonias en ninguna placa, el recuento se reporta como "menos de 1" multiplicado por la primera dilución de la muestra y se expresa como "Estimado del recuento estándar".

9.4 El número de colonias se expresa como ufc/g ó ml.

Apéndice B

Covenin 938-83. Leche Y Productos Lácteos. Métodos para la toma de Muestra.

4.2.1.3 Muestras destinadas al análisis microbiológico.

4.2.1.3.1 Todo el material de toma de muestras deberá ser esterilizado por uno de los métodos siguientes, según el caso:

- a- Exposición al aire caliente y seco (horno) a una temperatura de 170°C durante 1 h.
- b- Exposición al vapor a una temperatura de 121°C (autoclave) durante 15 a 20 minutos.
- c- Exposición al vapor a una temperatura de 100°C durante 1 h.
- d- Inmersión en agua a temperatura de ebullición durante 5 min.
- e- Tratamiento con alcohol etílico al 70% y exposición a la llama hasta eliminación total del alcohol.
- f- Exposición de las superficies que estarán en contacto con el producto, a la llama de un mechero.

4.2.1.3.2 Si se emplean los métodos (a) o (b), los recipientes y utensilios, deberán estar adecuadamente envueltos a fin de conservar las condiciones de esterilidad durante el almacenamiento. En caso de emplear los métodos restantes, el material deberá utilizarse inmediatamente.

La elección del procedimiento de esterilización dependerá del tipo de material y preferentemente deben emplearse los métodos (a) o (b).

4.2.2 Recipientes para las muestras

4.2.2.1 En caso de recipientes que no sean los originales, éstos deberán elaborarse a partir de un material apropiado, impermeable a los fluidos, insoluble, no absorbente, impermeable a las grasas y que no pueda influir en el olor, sabor o composición de los productos lácteos (vidrio, metal inoxidable materiales plásticos apropiados), de cierre hermético adecuado.

4.2.2.2 Los envases deberán ser de una calidad tal, que permita la esterilización según los métodos que se indican en el punto 4.2.1.3.1, si fuera necesario y de una forma y capacidad adecuada para el producto del que se han de tomar las muestras (tal como se haya definido para cada caso particular).

4.2.2.3 Los recipientes deberán estar secos y limpios.

4.2.4.3 No se podrán añadir sustancias conservadoras, a las muestras destinadas al análisis microbiológico u organoléptico y se mantendrán a baja temperatura (0°C a 5°C), excepto cuando se trate de productos lácteos conservados, que no requieran refrigeración y estén en sus envases originales sin abrir y herméticamente cerrados.

4.2.4.4 El análisis microbiológico de los productos líquidos se hará lo más rápidamente posible, y en todo caso, dentro de las 24 horas a partir del momento en que se ha tomado la muestra.

4.2.5 Transporte de las muestras

4.2.5.1 Las muestras se llevarán al laboratorio lo antes posible. Se adoptarán las debidas precauciones para evitar que durante el transporte estén expuestas directamente al sol y no se sometan a temperaturas menores de 0°C ni superiores a 5°C cuando se trate de productos perecederos.

4.2.5.2 Cuando se trate de muestras destinadas al análisis microbiológico, se utilizarán recipientes isotermos, que puedan mantener una baja temperatura (0°C a 5°C), excepto cuando se trate de productos lácteos conservados, que no requieran refrigeración y estén en sus envases originales sin abrir y herméticamente cerrados o en el caso de que el transporte sea de muy corta duración.

4.2.5.3 Las muestras de queso deberán conservarse en refrigeración y los quesos frescos y de pasta blanda deberán mantenerse a una temperatura entre 0°C y 5°C.

Apéndice C

Covenin 1126. Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico

6.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

6.2.1 Condiciones generales

6.2.1.1 El sitio donde se realizara el analisis microbiológico debera reunir las condiciones de asepsia indispensables. El material y equipo a utilizar deben estar convenientemente preparados, identificados y listos para su uso.

6.2.1.2 Cuando se abra el recipiente con la muestra debe evitarse cualquier tipo de contaminación.

NOTA: Si no se dispone de cabinas especiales, deben abrirse primero los productos que se supone tienen menor carga microbiana (pasteurizados, precocidos) y por último los crudos o desecados. Esto es con la finalidad de prevenir la contaminación del area de trabajo y así evitar contaminaciones cruzadas.

6.2.1.3 Las latas, jarras y otros recipientes cerrados deberan lavarse y secarse; desinfectar el area de preparación de la muestra mediante algun agente adecuado tal como el alcohol de 70°, el cual se elimina a la llama (flameado). No se deben flanear aquellos envases o empaques que puedan dañarse y/o explotar.

NOTA: En caso de que se requieran condiciones de asepsia más estrictas (prueba del deterioro microbiológico) deben utilizarse además otros desinfectantes, tales como el alcohol yodado (2 % de yodo) y compuestos derivados de amonio cuaternario.

Deben utilizarse cabinas especiales (flujo laminar). Si no se dispone de estas, deberan utilizarse areas desinfectadas y protegidas de las corrientes de aire.

6.2.1.4 Cuando el producto este envuelto en carton, papel celofan, papel aluminio y cualquier otro material de empaque similar, este debera limpiarse con una tela o esponja humedecida con un agente desinfectante (alcohol de 70°) para eliminar la contaminación superficial y el polvo. Debe darse una atención especial al area de abertura del empaque o envase.

6.2.1.5 Debe tomarse una muestra representativa del alimento.

6.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA SEGUN SU ESTADO FISICO

6.3.1 Si se trata de alimentos líquidos o material que fluya libremente, envasados en recipientes pequeños, debe agitarse por 25 veces haciendo un ángulo de 45° con el brazo o por rotación del recipiente hasta que el contenido sea homogéneo. En el caso de que los recipientes sean grandes y de difícil manejo se deben tomar muestras representativas y trasvasarlas asepticamente a envases estériles más pequeños.

6.3.2 Si la muestra está congelada, se deja descongelar en su recipiente original (o en el cual se recibió en el laboratorio) por un periodo de 15 minutos a 45°C en baño de agua mezclando continuamente o 18 horas entre 2 y 5°C. Si la muestra congelada puede trabajarse fácilmente (ej. un helado) se procede sin descongelar.

6.3.3 Si el material es sólido deben tomarse porciones de diferentes sitios del producto para tener una muestra representativa.

6.3.4 Cuando se tenga un material de difícil manejo debe colocarse en un recipiente grande y estéril, romperse en pequeños trozos usando métodos adecuados bajo condiciones asepticas y de allí se toma una muestra, la cual se transfiere a un recipiente estéril.

6.3.5 Si el contenido del envase es heterogéneo, se prepara una mezcla homogénea de todo su contenido o se analizan porciones separadas del mismo dependiendo del propósito del ensayo.

NOTA: En caso de alimentos que presenten una cubierta natural (huevos, ostras, etc), la modificación en la preparación de la muestra se especificará en la norma particular.

6.4. HOMOGENEIZACION Y PREPARACION DE LAS DILUCIONES

6.4.1. Muestras sólidas

6.4.1.1 Se pesan 10, 25 o 50g \pm 0,1 de la muestra en una jarra, frasco apropiado o en bolsas de polietileno, estériles, previamente tarados.

6.4.1.2 Se añaden 90, 225 o 450 ml de diluyente respectivamente (solución tampón fosfato o agua peptonada al 0,1 %).

6.4.1.3 Se homogeneiza por no más de 2 minutos a 8000 r.p.m.. Debe esperarse 2 - 3 minutos hasta que desaparezca la espuma formada. En el caso de emplearse un homogeneizador mecánico (Stomacher) se agita la muestra por un tiempo de 60 segundos.

NOTA 1: En el caso de alimentos sólidos cuya flora microbiana está limitada a la superficie (nari, nueces, almendras, pasas, aceitunas sin deshuesar u otros) se pesan 50 g y se añaden 50 ml del diluyente, se agita vigorosamente 50 veces en un ángulo de 45°. Cada ml de la solución de enjuague será equivalente a 1 g de muestra.

NOTA 2: Cuando se analicen alimentos con alto contenido de grasa (mayor de 20%) o polvos que formen grumos, pueden añadirse al diluyente, agentes humectantes tales como el tergitol 7 aniónico (1 % p/v) para facilitar la emulsificación (Ej: Quesos, crema de leche, mantequilla, chorizo, albúmina).

NOTA 3: Se recomienda tomar siempre que sea posible, la mayor cantidad de muestra (50 g) a fin de obtener resultados más confiables.

6.4.2 Muestras líquidas

6.4.2.1 Se miden con una pipeta 10 u 11 ml de la muestra y se transfieren a un frasco de dilución que contenga 90 o 99 ml respectivamente de diluyente (tampon fosfato o agua peptonada). En el caso de muestras muy viscosas (Ej: Chicha, jarabes, leche condensada, yogurt, crema de leche, pulpas de frutas) estas deben pesarse. En el caso de muestras líquidas con elevada cantidad de gas (refrescos, malta, agua mineral gasificada) deben trasvasarse a un recipiente estéril y agitar por rotación durante 15-30 minutos hasta que liberen el gas.

6.4.2.2 La muestra se agita luego 25 veces, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos.

NOTIA: La homogeneización de la muestra, bien sea sólida o líquida en la forma antes descrita, corresponde a la primera dilución (10^{-1}).

6.4.2.3 A partir de la primera dilución obtenida en 6.4.2.1 y 6.4.2.2 se procede de inmediato a preparar las diluciones necesarias de la siguiente forma:

6.4.2.3.1 Se mide 1 ml de la dilución 10^{-1} y se transfiere a un tubo que contenga 9 ml de diluyente o 10 u 11 ml de la dilución 10^{-1} y se transfiere a un frasco de dilución que contenga 90 o 99 ml respectivamente de diluyente para obtener la dilución 10^{-2} .

Se agita el tubo o frasco utilizado 25 veces, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos.

6.4.2.3.2 Se repite este procedimiento a fin de obtener las otras diluciones necesarias para el análisis (10^{-3}), (10^{-4}) etc. o aquellas que según la experiencia necesite el alimento o microorganismo objeto de análisis.

NOTIA: La inoculación del medio se debe llevar a cabo dentro de los 20 minutos siguientes a la preparación de las diluciones.