

Los hongos en el laboratorio: de la naturaleza al cultivo axénico

La Micología es una disciplina científica cuyo objeto de estudio son los hongos; las investigaciones pueden ser encaradas desde la fisiología, taxonomía, biogeografía, etc. Para llevar adelante cualquiera de estos estudios los micólogos necesitan trabajar con cultivos puros de hongos y además con materiales de herbario. Por lo tanto el primer paso es la recolección de ejemplares a partir de los cuales se intentará lograr cultivos axénicos (libres de contaminación) y luego estos ejemplares serán secados convenientemente para depositarlos en herbarios. Las investigaciones en fisiología y biotecnología, como por ejemplo el estudio de la regulación de la producción de enzimas o la optimización de la producción de antibióticos, necesitan de cultivos puros; mientras que aquellos estudios donde se explore la biología o la ecología de algún grupo de hongos, necesitan además de los herbarios. En esta nota se describe someramente el trabajo de los micólogos en obtener cultivos puros y especímenes de herbario.

Los hongos como objeto de estudio

Los hongos son un grupo de seres vivos con características muy particulares. Sus células forman largos filamentos, las hifas, que constituyen todo el entramado del organismo, sus paredes presentan un polisacárido sólo compartido con algunos animales, conocido como quitina, y se nutren exclusivamente por absorción, siendo incapaces de ingerir alimentos, como los animales, ni de sintetizarlos con ayuda de la luz, como hacen las plantas. Podemos verlos creciendo sobre alimentos, sobre madera, hojarasca y los más diversos sustratos, así como también sobre otros seres vivos, a modo de parásitos. También pueden desarrollarse en el suelo, pero siempre obteniendo su energía de fuentes orgánicas. Una vez alcanzado cierto tamaño, y por señales que casi siempre desconocemos, algunos de estos organismos producen sus fructificaciones. Estas son lo que la gente reconoce generalmente como un hongo, sin saber que la mayor parte del mismo consiste en un entramado microscópico difícil de ver, sumergido en el sustrato y que puede alcanzar una extensión considerable. El destino de estas fructificaciones es la producción y liberación de las esporas, encargadas de propagar la especie encontrando nuevos sustratos. La forma más conocida que toman estas estructuras reproductivas es el típico "hongo de sombrero", pero también las hay en forma de repisa, de estrella, de plato, de polvera y muchas otras más (Figura 1). Además del interés que los hongos despiertan en los científicos por su diversidad y belleza, son utilizados por el hombre desde tiempos inmemoriales como fuente de alimento o como remedio para algunos males. A estas utilidades se han sumado muchas otras en los últimos tiempos: son capaces de producir antibióticos o remedios contra la hipercolesterolemia. Pueden degradar contaminantes, controlar a otros microorganismos y producir las enzimas que se utilizan en las industrias tintorera, maderera y alimenticia.

por Francisco Kuhar,
Valeria Castiglia y
Leandro Papinutti

leandru@bg.fcen.uba.ar

Valeria Castiglia y Francisco Kuhar son licenciados en Ciencias Biológicas. Ambos trabajan en el laboratorio de Micología Experimental en la Universidad de Buenos Aires y son becarios doctorales (CONICET). **Leandro Papinutti** es licenciado en Micología Experimental en la Universidad de Buenos Aires.

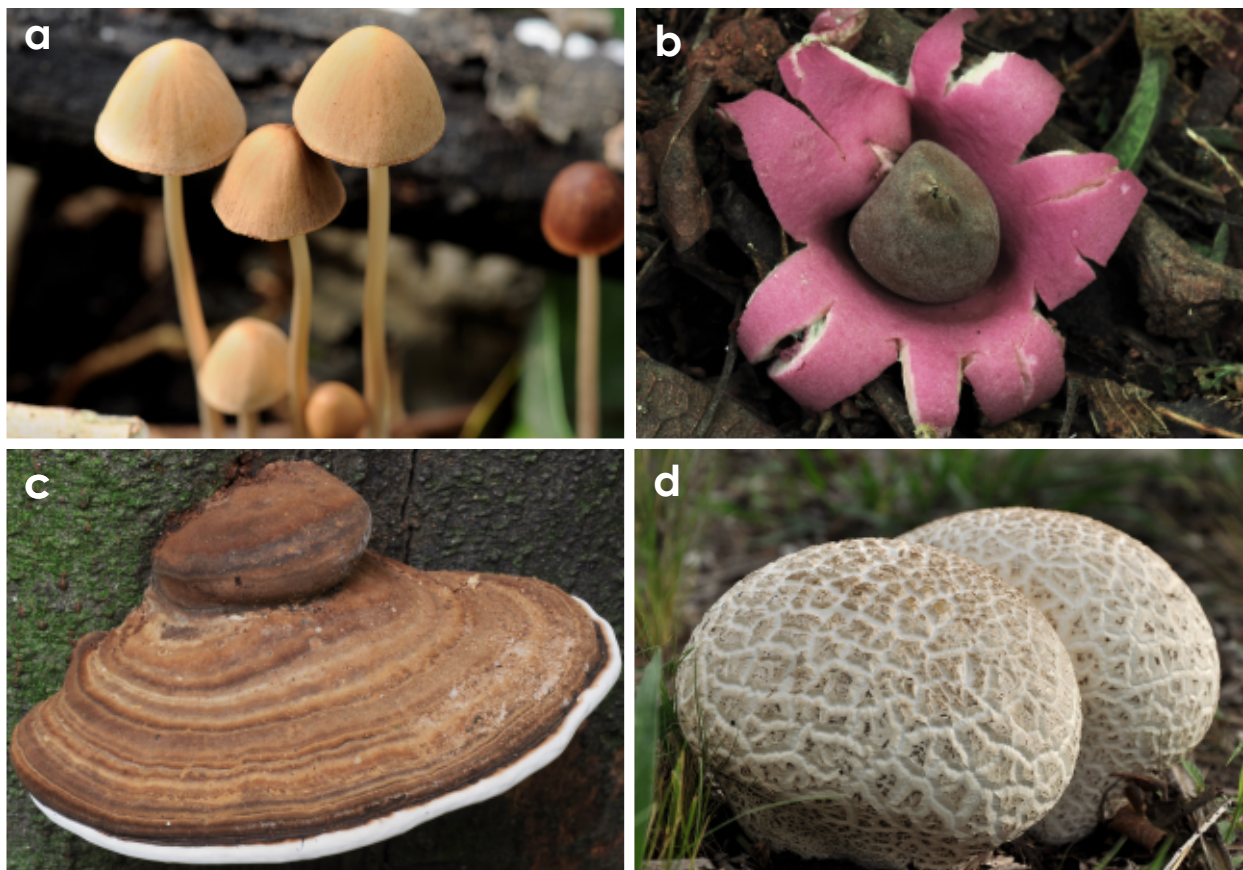


Figura 1: En la naturaleza los hongos muestran una enorme diversidad de formas, tamaños y colores. En las fotografías se observan: (a) los típicos hongos de sombrero; (b), hongos con forma de estrella; (c) hongos de repisa, muy comunes en troncos de árboles viejos o enfermos y (d) hongos con forma de polvera. Fotos: Leandro Papinutti.

De la naturaleza al laboratorio

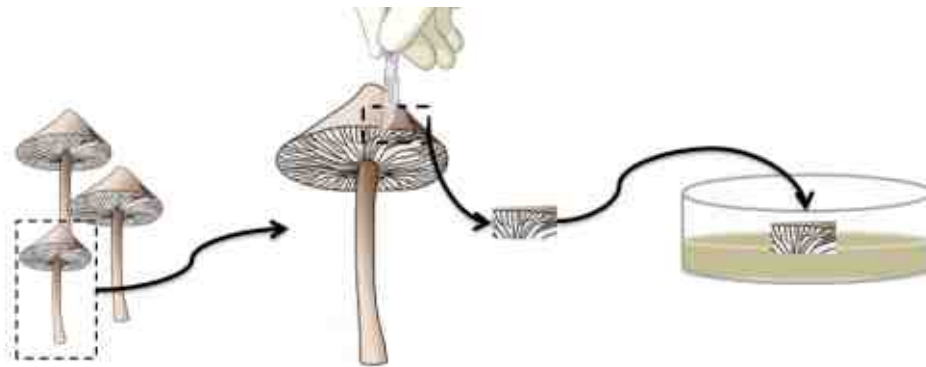
Para poder investigar estas capacidades y llevarlas a su aplicación final, es necesario poder cultivar en medios axénicos, es decir, separados de cualquier otro microorganismo. En muchos casos obtener estos cultivos es imposible, dado que sólo crecen en condiciones muy estrictas, o porque viven en estrecha simbiosis con otros seres vivos. Afortunadamente existen miles de especies capaces de crecer en medios sencillos y de bajo costo, haciendo posible la investigación y la producción a gran escala. Una de las tareas que llevan a cabo los micólogos, es la de trasladar a los hongos desde su ambiente natural al laboratorio, a fin de evaluar sus capacidades. La primera dificultad con que se enfrentan, es la de encontrarlos: hay que recorrer el ambiente revisándolo de manera exhaustiva a la busca de

signos que pueden pasar inadvertidos al ojo desatento. El siguiente paso consiste en recolectar los cuerpos fructíferos tratando de alterarlos lo menos posible, fotografíarlos, anotar datos del lugar y condiciones, y finalmente prepararlos para el transporte (Figura 2) y la confección del ejemplar de herbario; cada cultivo de hongos que se investiga, debe estar respaldado por un ejemplar del cuerpo fructífero seco encontrado en la naturaleza, dado que este es el documento que asocia al hongo con una especie conocida. Los herbarios pertenecen casi siempre a universidades o museos, y deben poner su material a disposición del científico que lo necesite de modo que la determinación pueda ser verificada cuantas veces sea necesario.



Figura 2: En la recolección de hongos es muy importante que se tomen todos los datos posibles en fresco, dado que algunas características se pierden o modifican tras la herborización. Es común que hongos de colores brillantes se tornen opacos y por lo tanto los colores en fresco son siempre anotados o fotografiados. Otra característica importante también suele desaparecer al secarse es el olor. Cada colección debe ir etiquetada, fotografiada, descrita y herborizada para su posterior identificación. Las cajas plásticas pueden ser muy útiles para preservar aquellos hongos muy frágiles, sobre todo los más chicos. Fotos: Leandro Papinutti.

Figura 3: Flujo de tareas en un laboratorio de micología: de los hongos encontrados en la naturaleza se eligen los más jóvenes y sanos para obtener cultivos puros; de los ejemplares colectados se toma una porción muy pequeña en condiciones asépticas y en un medio de cultivo apropiado. Una vez obtenida la cepa se la deposita en algún cepario público.



La puesta a punto para la investigación

Una vez en el laboratorio, lo primero que se hace es el aislamiento, esto es, se intenta iniciar un cultivo axénico antes de que el hongo muera. Para esto debe procederse en condiciones de higiene máxima, dado que miles de esporas de otros microorganismos esperan en el aire y las superficies listas para germinar cuando encuentran el medio adecuado. Se procede entonces a exponer una superficie de la fructificación que esté libre de gérmenes, por ejemplo, cortándolo con un bisturí estéril y accediendo a lugares que no han estado expuestos al medio. Con una pinza se recoge el "explanto", que consiste en una pequeña porción viva del cuerpo del hongo (Figura 3). Inmediatamente se lo pone sobre un medio de cultivo sólido de modo que dispongan de oxígeno y nutrientes para poder reanudar su crecimiento activo. En los hongos de pequeño tamaño o muy delgados, este procedimiento no es practicable, debido a que no es posible separar un explanto que no haya estado expuesto al ambiente. En estos casos hay que buscar alternativas. La más común es la de la esporada, que consiste en mantener el cuerpo fructífero sobre una superficie estéril en condiciones de alta humedad, hasta que se produzca la descarga de las esporas y de estas se obtiene el cultivo axénico.

El medio de cultivo preferido por casi todos los micólogos es el MEA. Para prepararlo se mezclan 12.7g de extracto de malta, 10g de glucosa y 20g de agar y luego se lleva a 1 litro con agua corriente y se esteriliza. Es un medio fácil de preparar y esterilizar, y permite a casi todos los hongos desarrollarse rápidamente por poseer vitaminas, proteínas, minerales, y muchos azúcares. Además, la presencia de agar hace que el medio sea sólido como una gelatina, de modo que los posibles contaminantes no se mezclan tan fácilmente con el hongo como lo harían si estuvieran libres en el seno de un líquido.

Si el aislamiento fue exitoso, al cabo de pocos días pueden verse las hifas extendiéndose sobre y dentro del medio. Esta forma indiferenciada de crecimiento que no recuerda en absoluto al cuerpo fructífero, se denomina micelio (Figura 4). Si quisiéramos observar este micelio con más detalle se puede hacer un preparado colocando

una pequeña muestra en un portaobjetos con una gota de agua y mirando al microscopio. Para lograr un mayor contraste se suele teñir el preparado. El colorante mayormente utilizado es la fucsina que tiñe todas las estructuras del micelio, pero también existen otros colorantes que se usan específicamente para detectar características propias de algún grupo de hongos, como por ejemplo el lugol que tiñe intensamente las esporas de algunos hongos tal como el peligroso *Amanita phalloides*.

Otra de las dificultades es la que se presenta en aquellos casos donde no hay cuerpos fructíferos visibles. En el caso de contar con un sustrato orgánico tal como una fruta o una madera infectada, es posible esterilizarlas superficialmente y disponerlas en recipientes cerrados saturados de humedad a la espera de que el micelio se haga visible sobre ellas. De allí es posible cultivar muchos hongos causantes de pudriciones y enfermedades en todo tipo de tejidos, incluso pelos y uñas humanas.

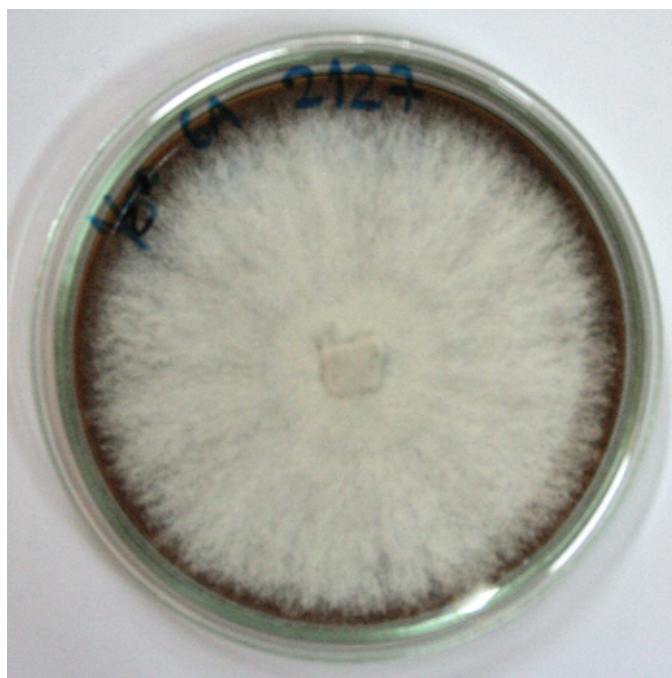


Figura 4: Los cultivos puros por lo general muestran un micelio homogéneamente distribuido sobre la placa. Foto: Leandro Papinutti.

Una última técnica sencilla e interesante, es el aislamiento por medio de trampas. Comúnmente se utilizan las trampas para obtener cultivos de hongos que viven en el suelo y que tienen la potencialidad para colonizar ciertos sustratos. Por ejemplo, si se quiere saber si el suelo posee hongos capaces de afectar a un cultivo de zapallos, se pueden poner en contacto trozos de zapallo y suelo, de modo que estos hongos los colonicen. Luego se esterilizan superficialmente estos trozos, y colocándolos en una cámara húmeda, se espera a que los signos del micelio sean visibles para iniciar el cultivo axénico.

Una vez completado el aislamiento, el hongo deberá ser transferido o "repicado" a nuevas placas de cultivo, de modo de asegurarnos que está creciendo sólo y sin la compañía de otros microorganismos. A partir de ese momento, el hongo está en condiciones de ser analizado en busca de antibióticos, enzimas, polisacáridos u otros de los tantos compuestos útiles para el hombre. Las enzimas fúngicas son ampliamente utilizadas en distintas industrias, por ejemplo en la industria alimenticia se utilizan pectinasas, xilanasas y celulasas para extraer y clarificar jugos,

aromas y aceites. En la industria jabonera se utilizan lipasas como componente de jabones en polvo para ayudar a quitar las manchas de grasas y aceites.

Otro grupo de enzimas muy importantes son las ligninasas, producidas por los hongos para degradar la lignina presente en materiales vegetales. Estas enzimas pueden ser utilizadas en la industria papelera para blanquear la pasta de papel y, debido a su baja especificidad, son capaces de degradar numerosos contaminantes como pesticidas, herbicidas, tinturas industriales, explosivos, etc. por lo cual pueden ser aplicadas en procesos de biorremediación.

Por otro lado, muchos de los antibióticos que utilizamos actualmente tienen su origen en metabolitos secundarios producidos por los hongos, así como las estatinas (compuestos utilizados farmacéuticamente para bajar los niveles de colesterol en sangre), que también fueron descubiertas en hongos.

Bibliografía recomendada

Stamets P. 1993. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms: Shokuyi Oyobi Yakuyi Kinoko No Saibai: a Companion Guide to The Mushroom Cultivator. Ten Speed Press.

Carlile, M. J.; S. C. Watkinson y G.W. Gooday. 2001. The Fungi (2nd Edition). Academic Press.



TEORÍA

Si usted es investigador y desea difundir su trabajo en esta sección, contáctese con Alejandro Ferrari (alejandro.ferrari@gmail.com)