

CARACTERIZACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES DE LOS COMPONENTES GRANULARES DE *ASPERGILLUS NIGER* Y *PENICILLIUM CANDIDUM* Y LA PRESENCIA DE MELANINA EN LAS FIÁLIDES

M. M. Herrera^a, A Molina^b, A Blanco^a, C Blanco^a, J. M. Navas^{a*}.

^aDepartment of Compared Anatomy and Pathology, University of Córdoba. Rabanales Campus. Faculty of Veterinary Carretera Madrid- Cádiz s / n, 14071 Córdoba, Spain

^bDepartment of Pharmacology, Toxicology and Forensic Medicine. University of Córdoba. Rabanales Campus. Faculty of Veterinary Carretera Madrid- Cádiz s / n, 14071 Córdoba, Spain

*Autor de correspondencia: JM Navas email: an3nallj@uco.es; phone: +34957218678; Fax: +34957 21 86 82

Recibido: Febrero 2017. Aprobado: Noviembre 2017.

Publicado: Diciembre 2017.

RESUMEN

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

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

Es importante conocer las granulaciones que se presentan en las métulas y fiálides, que participan activamente en la defensa de estos hongos. Son granulaciones específicas y similares en ambos hongos, hay que señalar las granulaciones proteicas y de mediana densidad electrónica que presentan estas células y que definitivamente son las responsables de la producción de las envueltas de las esporas. En cambio existe una diferencia importante en las granulaciones de *Aspergillus niger* en comparación con *Penicillium*; en *Aspergillus* se produce granulaciones muy densas a los electrones y que se identifican con melanina, protegiendo selectivamente a este hongo.

Keywords: Fiálides, métulas, melanina, TEM, *Aspergillus*.

STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATIONS OF THE GRANULAR COMPONENTS OF *ASPERGILLUS NIGER* AND *PENICILLIUM CANDIDUM* AND THE PRESENCE OF MELANIN IN PHIALIDES

ABSTRACT

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

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

One of the most important facts is to know the granulations that occur in the metulae and phialides, which participate actively in the defense of these fungi. As specific and similar granulations in both fungi, it is necessary to point out the proteinic and medium electron density granulations that these cells present and that are definitely responsible for the production of the spore shells. In contrast, there is a significant difference in the granulations of the *Aspergillus niger*

compared to the *Penicillium*; *Aspergillus* produces very dense granulations to the electrons and that are identified with melanin, which selectively protect this fungus.

Keywords: Phialides, metulae, melanin, TEM, *Aspergillus*.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los contaminantes biológicos que se encuentran en mayor cantidad en telas de cuadros, son hongos microscópicos y pólenes. El carácter saprofítico y parasitario de los hongos microscópicos, utilizando los componentes orgánicos de las pinturas de las maderas y telas de los lienzos para crecer, producen alteraciones que pueden llegar a la degradación de los cuadros. Debido a que han estado normalmente en zonas desprotegidas y a veces a la intemperie, se favorece que los hongos denominados de la humedad, fundamentalmente, sean los que contaminen a las telas de los cuadros [1]. Son muchos los hongos existentes que puedan realizar estos efectos, pero sin duda alguna el más numeroso es *Aspergillus niger* [2].

En los casos de degradación de las telas de cuadros por la acción de los hongos, resulta imprescindible realizar un diagnóstico y su posterior pronóstico [3]. El microscopio electrónico de barrido (SEM) se convierte en un medio ideal para descubrir la presencia de los hongos, ya que las esporas y las hifas se aprecian con estos microscopios. Pero estas identificaciones solo indican la presencia de los hongos contaminantes, no indicando el tipo de hongo del que se trata, y lo que es más importante, si se encuentran potencialmente activos, por lo que resulta muy importante realizar su identificación y conocer su viabilidad [4].

Son muchos los estudios que existen con el MO y SEM, que han sido utilizados para estudiar sus componentes celulares [5][6]. Con el uso del TEM se conocen la morfología íntima de dichos componentes, si bien existen descripciones de los conidios y las esporas, pero son escasos los estudios de las vesículas, de las metulas y fiálides.

El *A. niger* se define por su coloración negra de su conidióforo y se debe a la presencia de melanina, fundamentalmente en sus fiálides. La melanina en el mundo animal se considera como una sustancia de protección, disponiéndose en las zonas más periféricas y externas [7]. Diversos autores sugieren que la melanina favorece la virulencia de los agentes micóticos [8], y además los protegen de la respuesta de defensa del hospedador, y de los agentes oxidantes, reduciendo su fagocitosis por parte del hospedador [4][9].

La melanina se produce en el proceso de crecimiento y maduración del hongo de las que destacan últimamente *Aspergillus fumigatus*, pero por los que muestran una coloración específicamente negra en su evolución y crecimiento es *A. niger* [10][11].

Penicillium marneffe también se caracterizan por producir melanina. Pero la mayoría de ellos entre los que destaca *Penicillium candidum* carecen de melanina.

Uno de los objetivos principales que nos planteamos, es conocer cómo las propias células de los conidióforos, participan en producir diferentes sustancias que el propio hongo utiliza para su propia protección, y que lo producen células intermedias como las metulas y las fiálides. Estas sustancias protectoras la producen estas células almacenándolas en gránulos irregulares, y posteriormente formarán las envueltas de protección de las esporas. Pero además en *Aspergillus niger*, se sintetizan gránulos de melanina, que es la responsable del color negro de estos *Aspergillus*. Esta melanina protege de las radiaciones lumínicas.

También nos hemos planteado describir con microscopio electrónico de transmisión (TEM) de sus componentes, debido a que hay escasez de estos estudios microscópicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado hongos procedentes de varios lienzos de Valdés Leal, que estaban deteriorados y se iba a proceder a su restauración, encontrándose ésta en los pasos iniciales (Fig. 1a).

Tomadas las muestras, los hongos se cultivaron en agar Sabouraud glucosado y en Agar Czapek–Dox, éste último como cultivo específico para *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*.

Se utilizaron como métodos de detección de *Aspergillus*, por un lado, el test PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag (Ref 62794, BIO-RAD; USA) según las indicaciones del fabricante; por otro lado, se realizó diagnóstico molecular de DNA genómico con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCRrt), utilizando el suero ASPERGILLUS SSP Q-PCR ALERT AMPLIPROBE (Ref RTS110-P, NANOGEN; Italy) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo SmartCyclerR (Myconostica; UK). Con respecto a la detección de *Penicillium candidum* se utilizó el kit *Penicillium sp*. TaqMan PCR (Ref TM33200, Norgen Biotek Corp., Canada) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los hongos para su estudio se dispusieron en 2 lotes o grupos, dependiendo de la especie del hongo:

Primer grupo de hongos *Penicillium candidum* cultivados a los 10 días.

Segundo grupo de hongos *Aspergillus niger* cultivados a los 10 días

Para su estudio y descripción hemos seguido diferentes metodologías, utilizando tanto el microscopio óptico (MO) y el electrónico de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

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

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

realizaron improntas en los porta y fueron teñidas con azul de metileno.

Para su observación al microscopio electrónico las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2%. Las correspondientes al SEM se desecaron y se recubrieron con oro coloidal, en tanto que para TEM se incluyeron en resinas y tras su corte se contrastaron con acetato de plomo y citrato de uranilo.

Los estudios morfométricos se realizaron con TEM, se realizaron contando 10 cuadrados de cada rejilla, que suponen $10 \times 10,000$ y son $100,000 \mu\text{m}^2$ la superficie medida.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II® (Statgraphics.net, Madrid, Spain) para determinar la diferencia del tamaño de las fiálides y métulas entre los dos hongos estudiados. ANOVA (prueba *F*) fue aplicada para demostrar si existían diferencias significativas entre los valores. $p < 0.05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a las escasas descripciones existentes al microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las células que forman los conidióforos, vamos a realizar las descripciones de todos los componentes celulares de *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, con las diferentes microscopías pero fundamentalmente al TEM.

Primer grupo. Cultivo de *Penicillium candidum*

Macroscópicamente producen unas colonias bien desarrolladas, con uniformidad en el color, que son de color blanco nacarado y nunca muestra zonas negras (Fig.1b).

El componente esencial de estos hongos son los conidióforos, formados por un tallo y la cabeza penicilar. En este grupo se destaca que existe un pleomorfismo en

los conidióforos, intercalándose de pequeño y grandes tamaños (Figs.1d, 2a)

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

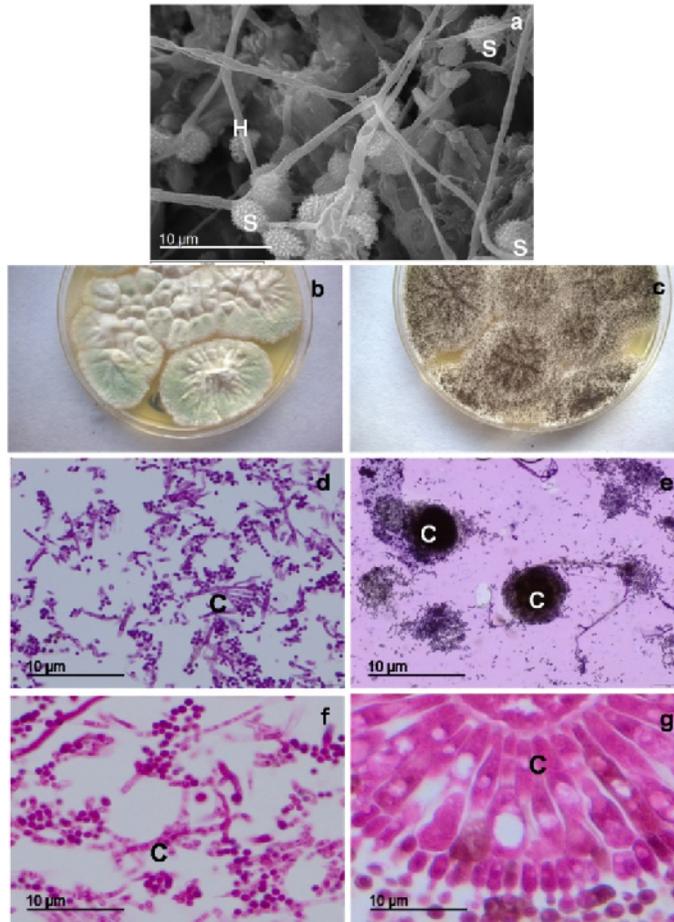


Fig. 1. **a.** Superficie de la pintura, en la que las hifas (H) y las esporas (E) se presentan bajo SEM. **b.** Cultivos de 10 días de colonias de *P. candidum* (C). **c.** Cultivos de 10 días de colonias de *A. niger* (C). **d.** Frotis de colonias de *P. candidum*, observando conidióforos grandes (C) y pequeños (c). **e.** Frotis de colonias de *A. niger*, observando conidióforos grandes y uniformes (C). **f.** Detalle al OM de conidióforos altamente pleomórficos (CP). H-E. Barra de 10 µm. **g.** Detalle al OM de conidióforos grandes y uniformes (C). H-E.

Tallo

Está formado por un tallo único, muy grueso y liso, sin que tenga ramificaciones y termina en una floración a modo de copa de vesículas y células eucariotas (Fig.1f). Al microscopio óptico se aprecia un contenido citoplasmático irregular con grandes depósitos líquidos, encerrados en grandes vacuolas (Fig.2c). Su estudio al TEM corresponde a un conjunto de células eucariotas con escasa actividad celular, encontrándose separadas entre sí por un espacio libre que corresponden a una

segmentación septal. La membrana celular es lisa y está envuelto en capas irregulares de proteínas. Son células grandes y alargadas, cuyo citoplasma contiene sobre todo residuos citoplasmáticos, con un núcleo de pequeño tamaño. En las zonas de separación entre las células existen restos de citoplasma y en los bordes de separación, pueden ser lisos en los casos que haya concluido la citocinesis celular o con uniones densas de membrana en los que aún no ha concluido la última fase de la división.

Vesículas

Están formadas por células eucariotas, que se caracterizan por presentar una membrana simple, el núcleo pequeño y denso, y lo que más se destaca es un citoplasma, que se caracteriza por que la mayoría de él contienen los organoides como son mitocondrias, retículo endoplásmico y complejo de Golgi y junto a ellas se localizan el núcleo. El resto de citoplasma está ocupado por gruesas vacuolas líquidas (Fig.2e).

Métulas

Formadas por células eucariotas, que se dividen por mitosis y se disponen a modo de una estrecha banda de células que se localizan topográficamente entre las vesículas y las fialides. Estos componentes suelen estar en escaso número, y se presentan en tanto la fase mitótica y vegetativa.

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

En la fase vegetativa, las métulas son esféricas de unos 3 μm de diámetro (Fig.2g), y al TEM son claros y de escasa densidad. Tienen un núcleo esférico y grande, que ocupa gran parte del citoplasma y muestra una envoltura nuclear dilatada con abundantes poros, y con un perfil irregular de bordes dentados, y de cromatina clara y homogénea, este hecho nos facilita la identificación de

estos componentes. El citoplasma es escaso, y tiene pocos organoides, apreciándose ribosomas y algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, y también se destaca mitocondrias que son escasas pero tienen un gran desarrollo. Finalmente destacamos que son células poco diferenciadas, y con escasa cantidad de sustancias metabólicas.

Fialides

Estas células eucariotas son las responsables esenciales en la formación de las células reproductoras. Se disponen en cúmulos a modo de mosaico y posteriormente en hileras. Estas células se caracterizan por presentar granulaciones; gránulos de naturaleza proteica de grandes proporciones y de escasa densidad electrónica. La presencia de estos gránulos son las responsables de producir las envueltas proteicas de los conidios.

Las fialides más cercanas a las métulas carecen de granulaciones y se denominan agranuladas (Fig.3a). Inicialmente carecen de gránulos que aparecen posteriormente. Tienen un tamaño alrededor de 5 μm de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaico, relacionados entre sí por una fina membrana. Son células ovoides o piriformes. Tiene un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones (Fig.3c). El citoplasma a pocos aumentos es uniforme e incluso de la misma densidad que el núcleo. Todas las fialides también se presentan en mitosis (Fig.3e).

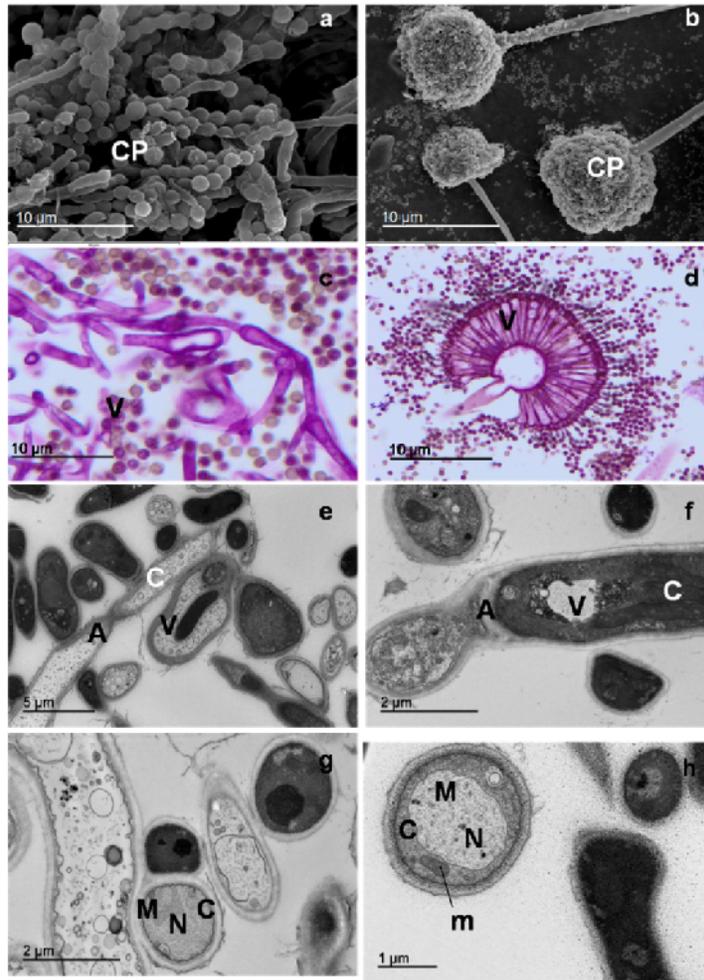


Figura 2. **a.** Detalle al SEM. Se pueden observar las cabezas pleomórficas de *Penicillium* (CP). **b.** Detalle al SEM. Se pueden observar abundantes cabezas de *Aspergillus*, grandes y uniformes (C). **c.** Detalle al OM del *P. candidum*. Se observaron vesículas (V) en la cabeza de *Penicillium*. PAS. **d.** Detalle bajo OM del segundo grupo. Se destacaron las vesículas largas (V) dispuestas en empalizada, con áreas PAS positivo. **e.** Detalle bajo TEM de *Penicillium*: vesículas alargadas (V) con contenido citoplasmático (C) y zonas amorfas (A). **f.** Detalle al TEM de *Aspergillus*: vesículas alargadas (V) con un contenido citoplasmático (C) y apenas zonas amorfas. **g.** Detalle al TEM del primer grupo. Una métula esférica (M) con un núcleo central claro (N) rodeado por un pequeño halo de citoplasma (C). **h.** Detalle al TEM del segundo grupo. Se observó una métula (M) con un núcleo claro (N) y un nucléolo prominente. El halo citoplasmático contenía mitocondrias (m) y gránulos amorfos (C).

Conidios

Son células de pequeño tamaño, de formas esféricas a ovoides, y suelen disponerse relacionadas entre sí a modo de hileras. Morfológicamente se configuran por dos componentes, el interno que corresponde a una pequeña célula eucariota, con escasos organoides, y las correspondientes cubiertas. En las cubiertas recién formadas, se destaca una densa y fina envuelta, que proviene de los gránulos densos de las filides que

posteriormente son excretados y organizan una membrana continua, homogénea y clara, con pequeñas espículas externas que se aprecian tanto al SEM como al TEM.

Esporas

Son muy numerosas, esféricas a ovoides, de superficie espiculada (Fig.3g). Están configuradas por dos elementos, el interno que es una célula eucariota que en

fases iniciales apenas tiene desarrollo, y que finalmente apenas se diferencian sus componentes, al tener todos ellos una densidad intensa y de contornos inapreciables. Y en segundo lugar las cubiertas externas, que si se

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

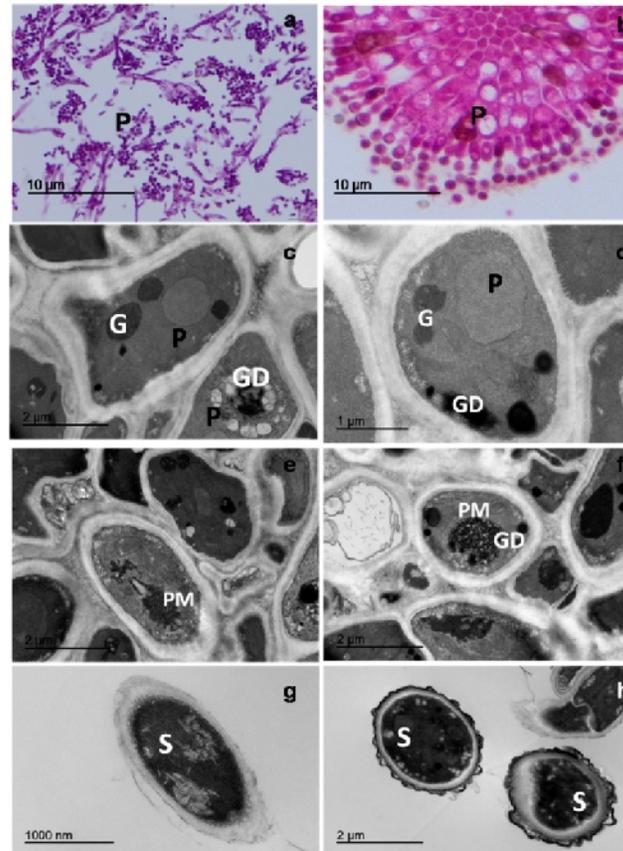


Fig. 3. **a.** Detalle al OM de la cabeza de *Penicillium*. Se observan pocos fiálides granuladas (P). **b.** Detalle bajo OM de la cabeza de *Aspergillus*. Pueden verse abundantes fiálides pigmentadas (PP). **c.** Detalle bajo TEM del primer grupo. Se puede observar fiálides (P) con un núcleo grande, uniforme y denso, con mitocondrias y gránulos de proteína (G) en su citoplasma. **d.** Detalle bajo TEM del segundo grupo. Las fiálides (P) muestran su núcleo excéntrico y en su citoplasma tienen dos tipos de gránulos, algunos de baja densidad (G) y otros son de alta densidad y más numerosos (GD). **e.** Detalle bajo TEM del primer grupo, con fiálides en la fase de división mitótica (PM). **f.** Detalle bajo el TEM del segundo grupo con un fiálide en mitosis (PM), y en su citoplasma se ven gránulos densos de melanina (GP). **g.** Detalle al TEM de esporas de *Penicillium* (S). **h.** Detalle bajo TEM de esporas de *Aspergillus* (S).

Segundo grupo. Cultivo de Aspergillus niger.

En nuestro trabajo hemos estudiado como segundo grupo de investigación, *Aspergillus niger* con 10 días en el medio de cultivo (Fig.1c).

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

y de un color negro intenso (Figs.1e, 2b). Todos los componentes que forman los conidióforos están presentes en la cabeza aspergilar y tienen la misma morfología, a excepción de las fiálides, que en definitiva son las responsables de la coloración negra de las colonias (Fig.1g). Por lo que el tallo, las vesículas, las méntulas, los conidios y las esporas son similares a las

estudiadas anteriormente, vamos a describir solamente las fiálides por sus diferencias morfológicas.

Fiálides

Estos componentes son más numerosos, y se disponen en hileras y también en mosaicos (Fig.2d). Estas células eucariotas, se pueden dividir por su morfología y composición en dos grupos; las fiálides granulares y las fiálides pigmentadas. Ambas células las encontramos en fase de mitosis y en fase vegetativa.

Fiálides granulares

Estas fiálides son las más jóvenes y tienen un tamaño alrededor de 5 μm de diámetro, y preferentemente se disponen en mosaico, relacionados entre sí por unas finas membranas. Son células ovoides o piriformes y tienen un núcleo bien desarrollado, dispuesto excéntricamente, con una cromatina clara y homogénea, su envoltura nuclear es lisa y apenas muestra invaginaciones. El citoplasma es uniforme e incluso tienen más densidad que el núcleo, con numerosos ribosomas y algunas cisternas de retículo rugoso, y también mitocondrias de densidad similar al citoplasma pero con abundantes crestas (Fig.2h). Algunas de estas células eucariotas, las hemos encontrado en división celular, mostrando todas las fases de las placas mitóticas, si bien los cromosomas están poco individualizados, y se disponen como acúmulos de cromatina densa. En su citoplasma se aprecia gránulos de escasa densidad que participarán en la formación de las cápsulas de los conidios (Fig.3d).

Fiálides pigmentadas

Las fiálides pigmentadas son muy similares a las anteriores, aunque con dos diferencias esenciales, por una parte, son de mayor tamaño de alrededor de 6 μm de diámetro, y sobre todo la existencia en el citoplasma de varios gránulos como los anteriores, pero sobretodo gránulos muy densos, de grandes proporciones, y formados exclusivamente por material muy denso y

homogéneo (Fig.3b). Estas últimas granulaciones las identificamos como melaninas que serán las responsables de la coloración negra de las colonias. Y al microscopio óptico le da una coloración parda de su citoplasma. Son frecuentes las divisiones mitóticas (Fig.3f). Los conidióforos y las esporas son similares a las descritas en el grupo anterior (Fig.3h).

Análisis estadístico

En el estudio morfométrico se ha estudiado el tamaño de las fiálides y las métulas de cada hongo, comparando sus medias. Con respecto al primer elemento (fiálides) observamos que existe una diferencia significativa entre el tamaño de las fiálides de *P. candidum* y *A. niger* ($p < 0.05$) (Fig.4). Con respecto a las métulas observamos que no existe diferencia significativa entre el tamaño de las métulas de *P. candidum* y *A. niger* ($p > 0.05$) (Fig.5).

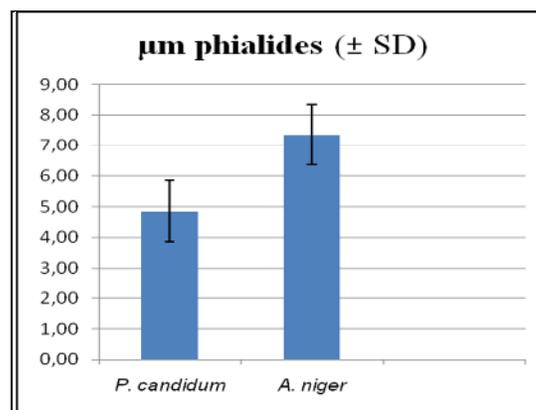


Fig. 4. Representación gráfica de la variación del tamaño de fiálides en cada uno de los lotes. Los tamaños medios de fiálides, fueron significativamente mayores en el grupo *A. niger*. Significativamente diferente del grupo *P. candidum* con $p < 0.05$.

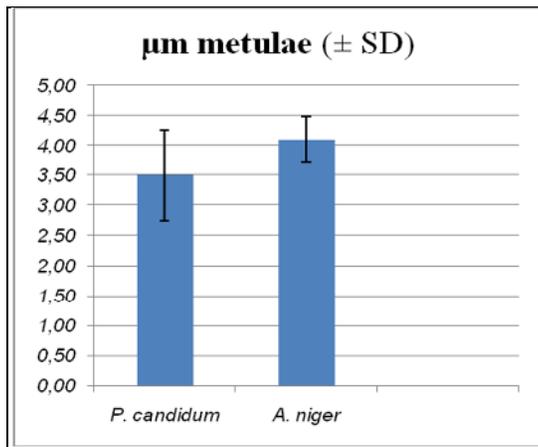


Fig. 5. Representación gráfica de la variación del tamaño de las métulas en cada uno de los lotes. Los tamaños medios de las métulas no fueron significativamente mayores en el grupo *A. niger*. No significativamente diferente del grupo *P. candidum* con $p > 0,05$.

Uno de los objetivos del presente trabajo, ha sido realizar una descripción de los componentes celulares del *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum*, identificarlos previamente y realizar un análisis funcional entre los diferentes componentes [2][12][13]. Existen diferentes estudios realizados con el microscopio óptico y electrónico de barrido (SEM) [6], en tanto apenas existen identificaciones y descripciones de estos elementos al microscopio electrónico de transmisión (TEM), por lo que consideramos que uno de los puntos esenciales de nuestro trabajo son los estudios ultraestructurales, que nos ha permitido conocer su morfología íntima, y comprender su función en el metabolismo general de estos hongos. Por otra parte, este trabajo ha permitido no solo conocer los componentes que aislamos de las telas de los cuadros, las esporas e hifas, sino que tras su cultivo nos ha permitido su identificación y conocimiento de su viabilidad y pronóstico para realizar la restauración de los cuadros afectados.

En nuestras investigaciones se identificó *Aspergillus niger* y *Penicillium candidum* [14][15], y el motivo de realizar sus estudios tanto al microscopio óptico como al electrónico, y sobre todo al TEM, es identificar todas las células eucariotas que se forman en los conidióforos y realizar la descripción de la estructura y ultraestructura

de dichas células, para su identificación y su posterior comprensión de su funcionalidad [1].

Lo primero que hemos tenido en cuenta es la viabilidad de estos hongos en las telas de los cuadros alterados, y el hongo que preferentemente predomina es *Aspergillus niger* [4], que se caracteriza por ser uno de los que están más relacionados con la humedad, y mantenerse activos en dichas localizaciones.

Tanto al MO como al SEM, existen estudios previos que nos han permitido no solo su identificación sino el conocimiento de sus componentes celulares [6]. En tanto que al existir escasos trabajos al TEM, y los que existen son incompletos, nuestras descripciones han sido nuestra mayor aportación al conocimiento de estos hongos. El hecho de ser escasos e incompletos los trabajos al TEM, solo los hemos podido usar en el estudio de algunas de sus células como son los conidios y esporas.

Hemos comprobado al TEM, que los septos de las hifas, corresponden a fases de citocinesis de la mitosis, en las que se han producido una separación de las células hijas, o pueden mantener puntos de uniones. Con el MO también se aprecian con nitidez las septaciones, debido al contenido citoplasmático de las células hijas y sobre todo por la existencia de membranas de separación muy gruesas [3].

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

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

Como hemos apreciado en los estudios del ME de los conidióforos, las células eucariotas que tienen mayor actividad funcional son las fiálides. Por una parte el gran número de mitosis que hemos observado indica un aumento en el número de células que posteriormente se transformaran en los conidios, y que no solo actúa como una zona germinal, sino que, al contrario, sus numerosos componentes citoplasmáticos facilitarían la formación de los conidios e incluso darle la coloración negra a las colonias en el caso *A. niger* [8]. Dentro de las granulaciones existentes se desprende dos funciones importantes, en primer lugar, los gránulos proteicos claros, tienen una clara función de producir las envueltas de los conidios y posteriormente las esporas. Y en esta formación de los gránulos proteicos participa fundamentalmente su retículo rugoso. Y en segundo lugar los gránulos muy densos corresponden a melanina. De las descripciones que hemos realizado tanto al microscopio óptico como electrónico de transmisión, se deduce que la coloración negra de las colonias se debe a la presencia de pigmentos de la melanina, y que estos pigmentos se localizan fundamentalmente en las fiálides pigmentadas [9][10]. Hemos podido comprobar que en aquellos conidióforos cuyas fiálides contienen más pigmento se traduce en una mayor coloración de las colonias [5]. En las colonias jóvenes en las que su coloración es homogénea y apenas oscura, indica que la melanina es escasa y está distribuida uniformemente, en tanto que en las colonias de larga duración de su cultivo, macroscópicamente el aumento del color negro y su disposición central en la colonia, parece indicar que los conidióforos tienen un mayor número de fiálides pigmentadas, y que se disponen de forma radial y concentradas en el centro de las colonias [7].

Melanina

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

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

CONCLUSIONES

Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* desarrollan en las méticas y fiálides con gránulos densos, que son precursores de las envueltas de las esporas, observados con TEM.

Aspergillus produce en las méticas y fiálides melanina, que participa en la coloración y defensa del propio hongo, apreciándose con TEM.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por los grupos de investigación PAIDI BIO-218 "Histología e Histomorfometría" y PAIDI AGR-101 "Anatomía y Embriología" de la Universidad de Córdoba en el Plan Andaluz de Investigación. Los autores también están agradecidos al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI), en su Servicio de Asesoramiento Científico Microscopía Electrónica, Universidad de Córdoba, por su colaboración en este estudio. No hay conflicto de intereses que declarar.

REFERENCIAS

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

- [2] Loudon KW, APCoke, JP Burnie, AJShaw, BA Oppenheim, CQ Morris. (1996) "Kitchens as a source of *Aspergillus niger* infection". *Journal of Hospital Infection* 32: 191-198.
- [3] Schuster E, N Dunn-Coleman, J Frisvad, P van Dijk. (2002). "On the safety of *Aspergillus niger* – a review". *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 426-435.
- [4] Bowen A, F Davidson, R Keatch, G Gadd. (2007). "Effect of nutrient availability on hyphal maturation and topographical sensing in *Aspergillus niger*". *Mycoscience* 48: 145-151.
- [5] Kusters van Someren MA, RA Samson, JVisser. (1991). "The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate". *Current Genetics* 19: 21-26.
- [6] Accensi F, J Cano, L Figuera, ML Abarca, FJ Cabañes. (1999) "New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate". *FEMS Microbiology Letters* 180: 191-196
- [7] Tsai HF, YC Chang, RG Washburn, MH Wheeler, KJ Kwon-Chung. (1998). "The developmentally regulated *ALB1* gene of *Aspergillus fumigatus* : its role in modulation of conidial morphology and virulence". *Journal of Bacteriology* 180: 3031-3038.
- [8] Youngchim S, R Morris-Jones, RJ Hay, AJ Hamilton .(2004). "Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*". *J Med Microbiol.* 53: 175-181. 10.1099/jmm.0.05421-0.
- [9] Jahn B, A Koch, ASchmidt, G Wanner, H Gehringer, S Bhakdi, AA Brakhage.(1997). "Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence". *Infect Immun.* 65: 5110-5117.
- [10] Jacobson ES. (2000) "Pathogenic roles for fungal melanins". *Clin Microbiol Rev.* 13: 708-717. 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.
- [11] Hamilton AJ, BL Gomez. (2002). "Melanins in fungal pathogens". *J Med Microbio* 151: 189-191.
- [12] Minter DW, DL Hawksworth, AHS Onions, Z Kozakiewicz. (1985). "Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium* En: Samson RA y JI Pitt (Eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematic*". New York *Plenum Press*: 71-82.
- [13] Stephenson KS, NAR Gow, FA Davidson, GM Gadd. (2014) "Regulation of vectorial supply of vesicles to the hyphal tip determines thigmotropism in *Neurospora crassa*". *Fungal Biology* 118(3): 287-294.
- [14] Vermani, M, VK Vijayan, MK Agarwal. (2015). "Identification of *Aspergillus* (A *flavus* and A *niger*) Allergens and Heterogeneity of Allergic Patients' IgE Response". *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 14(4), 361.
- [15] Alhelli AM, MY Abdul Manap, AS Mohammed, H Mirhosseini, E Suliman, Z Shad, AS Meor Hussin. (2016). "Response Surface Methodology Modelling of an Aqueous Two-Phase System for Purification of Protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under Solid State Fermentation and Its Biochemical Characterization". *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1872.