

# Cuantificación de *Penicillium* sp. por el método de goteo en placa

Yolanda Elizabeth Morales-García<sup>1,2</sup>, Jessie Hernández-Canseco<sup>2</sup>, Guadalupe Ramos-Castillo<sup>2</sup>, Rocío Pérez-y-Terrón<sup>1</sup>, Jesús Muñoz-Rojas<sup>2</sup>

Laboratorio de Microbiología Molecular<sup>1</sup>, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana<sup>2</sup>  
Escuela de Biología, BUAP<sup>1</sup>, CICM-Instituto de Ciencias, BUAP<sup>2</sup>  
Puebla, Pue.; México

[lissiamor, jessiehdz\_canseco]@yahoo.com.mx, [lu.jade, rocperez33, joymerre]@hotmail.com

**Abstract**— Quantification of microorganisms is critical for studies of microbiology. The aim of this study was to explore the efficiency of the drop plate method for quantify a fungi isolated from soils. For this, some fungi isolated from Papalotla-Tlaxcala, México soils were characterized as *Penicillium* sp. and one of them was chosen to be quantified by the drop plate method and the plating method, from a fungi suspension. Both methods were proficient for fungi quantification, but the first was more rapid and economic; for that reason, this was used to quantify to *Penicillium* sp. during different growth stages in liquid media. The drop plate method could be used for quantification of other dimorphic fungi.

**Keyword**—*Penicillium* sp., drop plate, plating, fungal growth, fungi quantification.

**Resumen**— La cuantificación de microorganismos es fundamental para estudios de microbiología. El objetivo de este trabajo fue el de explorar la eficiencia del método de goteo en placa para cuantificar a un hongo aislado del suelo. Para ello, algunos hongos aislados de suelos de Papalotla-Tlaxcala, México, se caracterizaron como *Penicillium* sp., y uno de ellos se eligió para ser cuantificado mediante el método de goteo en placa y el de plaqueo, a partir de una suspensión. Ambos resultaron eficientes pero el primero fue más rápido y económico; razón por la que se usó para cuantificar al hongo durante distintas etapas de crecimiento en medio líquido. El método de goteo en placa podría ser de gran utilidad para cuantificar otros hongos dimórficos.

**Palabras claves**— *Penicillium* sp., goteo en placa, plaqueo, crecimiento de hongos, cuantificación de hongos.

## I. INTRODUCCIÓN

La cuantificación de microorganismos es fundamental en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica. No solo es importante conocer al responsable de un efecto benéfico o identificar al microorganismo potencial de causar alguna infección severa, sino también es importante conocer el número de microorganismos implicados, para determinar si el microorganismo en cuestión será capaz de desarrollar una función benéfica o perjudicial [3]. Por ejemplo, se requieren alrededor de  $10^9$  Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de la bacteria del género *Rhizobium*/gramo (g) de nódulo en leguminosas, para que se lleve a cabo una fijación biológica de nitrógeno efectiva [21]. También es conocido que para obtener una promoción de crecimiento de plantas exitosa se requiere una población de la bacteria *Azospirillum* en un rango de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g de suelo [13]. El agua para consumo humano debe cumplir con ciertas normas, la Organización Mundial de la Salud estipula que el agua potable que se destina para uso doméstico no debe contener bacterias coliformes [19]. La calidad del agua se ha clasificado en función de la presencia de estos microorganismos en: A; completamente satisfactoria (0 Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (UFC/ml)), B; satisfactoria y representa riesgo bajo (1-10 UFC/ml, C; marginalmente insatisfactoria (10-100 UFC/ml), D; insatisfactoria con riesgo alto (100-1000 UFC/ml), E; inaceptable con riesgo muy alto (>1000 UFC/ml) [20].

Existen varias estrategias para contabilizar a los microorganismos en muestras ambientales y de laboratorio. Por ejemplo el método de plaqueo, el método de vaciado en placa, el método de goteo en placa [8, 10], el método del número más probable [1] y recientemente dos métodos para el recuento masivo han sido planteados: el método de goteo en placa 6X6 [2] y el método de goteo por sellado en placa masivo (GSPM) [3, 11]. En general las metodologías se basan en realizar diluciones seriadas 1:10, para colocar muestras de cada dilución en un medio de cultivo, generalmente gelificado; sin embargo cada método presenta variantes que lo caracterizan. Quizás una de las técnicas cuyo uso se ha intensificado en nuestros días para el recuento bacteriano, es la técnica de goteo en placa, debido a que ésta es fácil, rápida y económica. El goteo en placa consiste en colocar gotas de 20 µl de cada una de las diluciones seriadas en placas de medio gelificado y después de su crecimiento se cuenta el número de colonias presentes y se realizan los cálculos requeridos.

Las células fúngicas, tradicionalmente se han contado usando técnicas del número más probable, métodos de plaqueo [12] y en el caso de muestras de suelo se usan métodos de tamizado para cuantificar micorrizas [5]. Algunos hongos presentan la ventaja de crecer de forma dimórfica; en medio líquido crecen como células independientes (levaduriforme) y en medio gelificado crecen en forma miceliar. En el presente trabajo evaluamos si la técnica de goteo en placa es una metodología útil para cuantificar el número de células fúngicas dimórficas presentes en muestras líquidas, en distintas etapas de crecimiento, similar a lo que se ha propuesto para bacterias en una curva de crecimiento característico. Se usó como modelo al hongo: *Penicillium* sp. UAPGRC-1 (Universidad Autónoma de Puebla, Green Root Colonization-1), un hongo aislado de suelo de la región central de México.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. Aislamiento y caracterización de *Penicillium* sp.

A partir de un suelo de San Diego Buenavista de Papalotla, Tlaxcala-México, se tomó un gramo de suelo en un tubo Falcon estéril a 20 cm de profundidad. Este fue diluido en proporción 1:10 P/V y sometido a 4 diluciones seriadas 1:10 V/V. Cien microlitros de cada dilución fueron plaqueados en medio MESMA [7, 15] con 80 µg/ml de cloranfenicol (MESMA-Cm<sup>80</sup>) con el fin de dar preferencia al crecimiento de hongos. Las colonias de hongos independientes de las diluciones más altas fueron sembradas en placas nuevas MESMA-Cm<sup>80</sup>, para su caracterización posterior mediante ensayos fenotípicos.

### B. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

Las colonias fueron crecidas durante 5 días en medio PDA (agar papa dextrosa). La morfología de crecimiento fue registrada y fotografiada. La identificación y corroboración del género fúngico se realizó con un microscopio compuesto, utilizando manuales de identificación [17, 18]. Para la observación microscópica se realizó lo siguiente: en cajas Petri estériles de vidrio se colocó un triángulo de vidrio y encima de él, un portaobjetos estéril con 1 cm<sup>2</sup> de medio PDA grueso de aproximadamente 0,05 cm. El PDA fue inoculado por picadura con el hongo de interés en cada uno de los lados del bloque de agar para su caracterización. Después, se colocó un cubreobjetos estéril, presionando ligeramente al cuadrado de PDA. El fondo de la placa fue adicionada con 5 ml de glicerol al 15% para mantener la humedad y el sistema fue cerrado. Las placas se colocaron a incubación a 28°C durante 5 días. Al concluir el periodo de incubación, se retiró el cubreobjetos para teñirlo con azul de metileno. Una de las cepas caracterizada fue designada con el nombre de *Penicillium* sp. GRC-1.

### C. Comparación del método de plaqueo y el método de goteo en placa para la cuantificación de células de *Penicillium sp.* UAPGRC-1

*Penicillium sp.* UAPGRC-1 fue crecido en 100 ml de medio MESMA durante 5 días. La suspensión obtenida se sometió a diluciones seriadas 1:10 hasta  $10^{-6}$ . A partir de cada dilución se colocaron muestras de 100  $\mu$ l para plaqueo en medio PDA gelificado (Bioxon) o bien réplicas de 20  $\mu$ l en medio PDA gelificado para el método de goteo en placa [8, 10]. El crecimiento de colonias en ambos casos fue visualizado y se realizaron los cálculos para conocer el número de Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (No. UFC/ml) de células presentes en la suspensión original por ambos métodos. Cinco réplicas independientes fueron ensayadas para cada método y su comparación estadística fue llevada a cabo mediante *t*-student usando Sigma plot de Systat Software Inc.

### D. Curvas de crecimiento de *Penicillium sp.* UAPGRC1 mediante el método de goteo en placa

A partir de preinóculos de 72 horas, *Penicillium sp.* fue crecido en medio líquido MESMA, iniciando en una densidad celular de 0.05 de absorbancia. En distintas etapas de crecimiento se determinó el No. UFC/ml en medio PDA gelificado, mediante la técnica de goteo en placa. La curva de crecimiento de *Penicillium sp.* se determinó tres veces en cada medio de cultivo.

Las características morfológicas de las colonias cuantificadas en el método de goteo en placa fueron corroboradas, para ello, se tomaron colonias de cada placa aisladas (dilución contable). Las colonias fueron crecidas durante 5 días en medio PDA gelificado y el crecimiento y características microscópicas de las colonias fueron ensayadas como se describió anteriormente.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El medio MESMA fue inicialmente diseñado para el crecimiento de bacterias como el caso de *Gluconacetobacter diazotrophicus* [7, 15], sin embargo, a partir de las muestras de suelo exploradas en este trabajo, crecieron varias morfologías de hongos en medio MESMA-Cm<sup>80</sup>. Con base en la morfología, cinco de los hongos más abundantes que fueron aislados y crecidos en medio PDA, mostraron colonias pulverulentas, cerebriformes, de color gris-verdoso en el anverso y marrón en el reverso, redondeadas con radiaciones, borde regular, superficie lisa, y apariencia en forma de cojín (Fig. 1). Además, mediante microscopía óptica y tinción de azul de metileno se observaron conidias típicas de hongos del género *Penicillium* (Fig. 2), observando conidióforos septados con ramificaciones en forma de cepillo [17, 18]. Estos hongos que fueron capaces de crecer en MESMA-Cm<sup>80</sup>, a partir de muestras de suelos, donde se observaron en el rango de  $4 \times 10^3$  UFC/g de suelo ( $\pm 1 \times 10^3$ ). Uno de estos hongos fue denominado *Penicillium sp.* UAPGRC-1 y se eligió al azar como modelo para evaluar su curva de crecimiento. Cabe señalar que cepas del género *Penicillium* también se han reportado abundantes en la rizósfera de arbustos de té [14].

La comparación del método de plaqueo vs el de “goteo en placa” a partir de suspensiones de *Penicillium sp.* UAPGRC-1, mostró que ambos métodos son buenos para la cuantificación de las células fúngicas en medio líquido sin diferencias estadísticas significativas mediante la prueba *t*-student, a una  $P \leq 0.05$ . Los valores observados del número de células en ambos métodos estuvieron en el rango de  $3-6 \times 10^7$  UFC/ml (figura 3). Al igual que ocurre con la cuantificación con bacterias, el método de goteo en placa representa una herramienta con el mismo poder de resolución que el método de plaqueo con las

ventajas de ahorro de placas, tiempo y material para realizar la cuantificación, lo que hace preferir al método de goteo en placa para posteriores cuantificaciones [8].



Fig. 1. Crecimiento de la cepa de *Penicillium sp. GRC-1* en medio PDA.

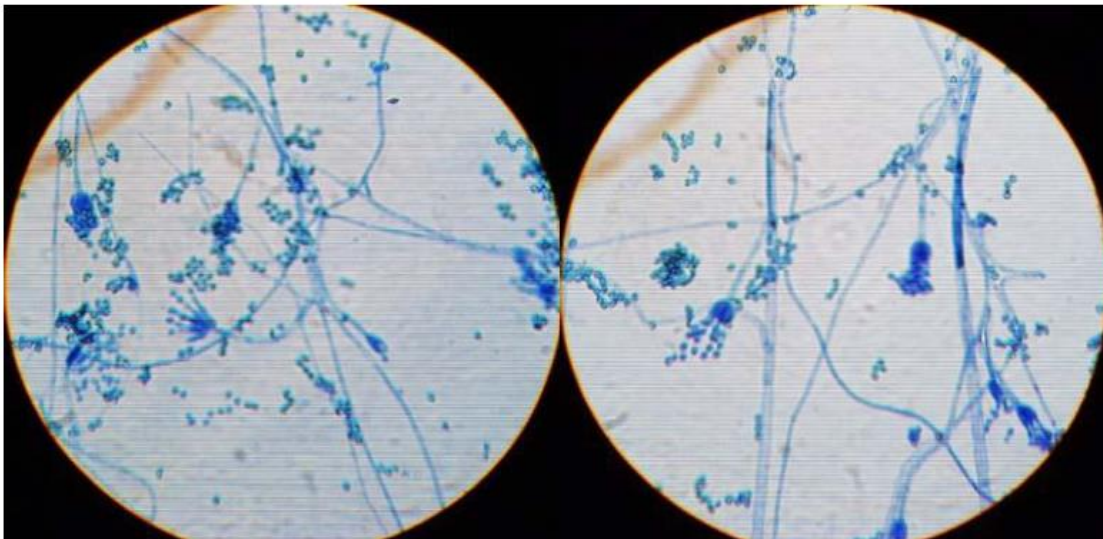


Fig. 2. Conidióforos de *Penicillium sp. GRC-1* observado mediante microscopio óptico (40X).

En la actualidad las metodologías para cuantificar a los microorganismos son distintas y algunas muy precisas que requieren una tecnología costosa están disponibles, como por ejemplo la cuantificación de micorrizas y otros hongos a través de PCR de tiempo real (PCR de sus siglas en inglés que significa reacción de polimerasa en cadena) [4, 6, 9, 16]. Sin embargo, la cuantificación de hongos microscópicos a través de una metodología rápida y económica es deseable. La metodología de goteo en placa ofrece una alternativa de cuantificación de bacterias para estudios de comportamiento en medios de cultivo o

en sus hábitats naturales. Aun cuando la metodología ha sido muy explorada para bacterias, ésta resultó de gran utilidad para cuantificar a hongos de tipo dimórfico como en el presente trabajo se muestra.

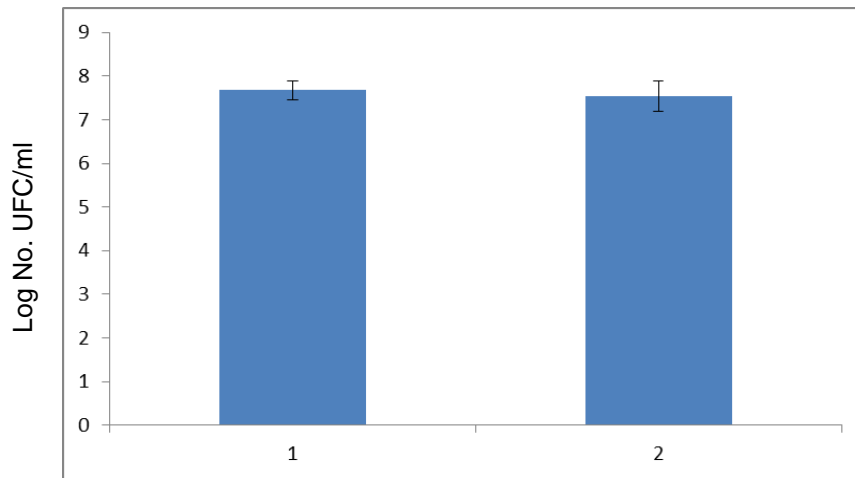


Fig. 3. Cuantificación de *Penicillium* sp. GRC-1 mediante goteo en placa (1) y plaqueo (2).

*Penicillium* sp. UAPGRC-1 creció de forma efectiva en medio MESMA. La metodología de goteo en placa permitió contabilizar a *Penicillium* sp. en sus distintas fases de crecimiento en medio líquido (Fig 4 y Fig. 5). La cuenta de colonias tuvo que realizarse antes de que las colonias maduraran con la apariencia característica de *Penicillium* sp. (Fig. 4), debido a que si esperamos mayor tiempo las colonias se fusionan y se vuelve imposible distinguir entre una colonia y otra. *Penicilium* sp. fue capaz de crecer en medio MESMA líquido alcanzando la fase estacionaria aproximadamente a las 100 horas.

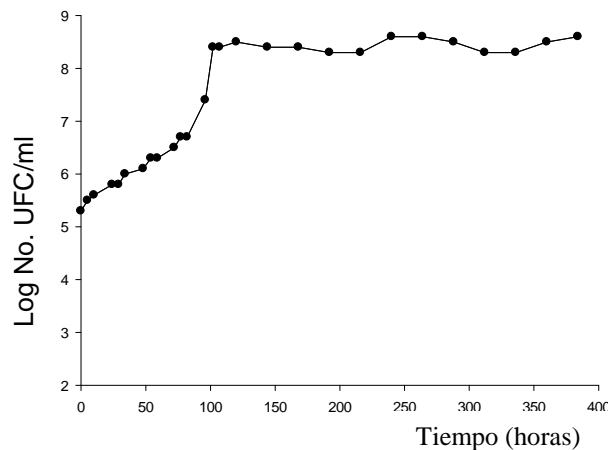


Fig. 4. Curva de crecimiento de *Penicillium* sp. GRC-1 en medio líquido y cuantificación mediante goteo en placa.

Las características del hongo cuantificado fueron corroboradas mediante ensayos morfológicos y de microscopía. Las colonias observadas en las placas de goteo en placa fueron colocadas en medio PDA observado un crecimiento característico (no mostrado).



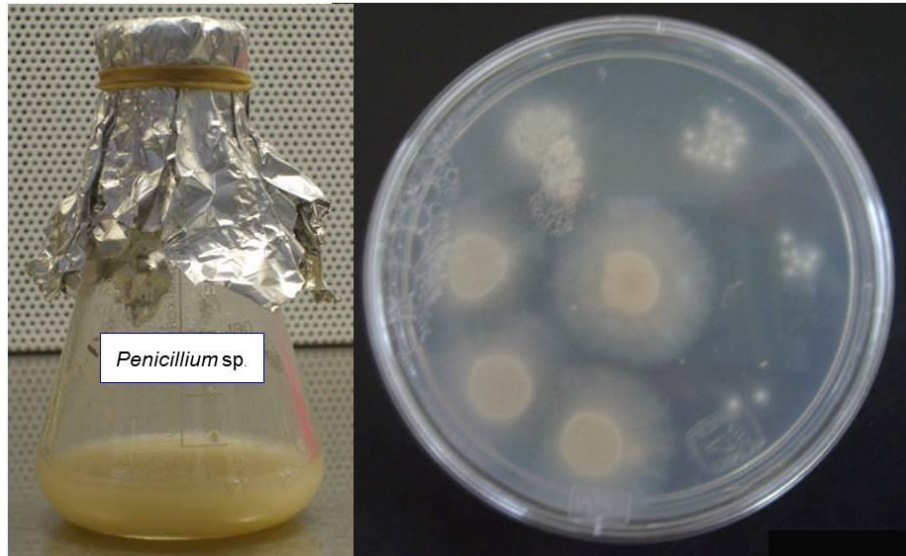


Fig. 5. Apariencia de *Penicillium* sp. GRC-1 en medio líquido y en medio PDA gelificado (método de goteo en placa).

La técnica de goteo en placa representa una enorme herramienta para la cuantificación de hongos dimórficos en su fase levaduriforme, ahorra tiempo y es igual de eficiente que el método de recuento en placa. Con este método se podrían realizar estudios fisiológicos del comportamiento de diversos hongos dimórficos, ya sea en asociación con hospederos o en experimentos de laboratorio. En el trabajo presente, la herramienta de recuento por goteo en placa permitió evaluar la curva de crecimiento de *Penicillium* sp. GRC-1 en medio líquido MESMA y nos facilitará en trabajos futuros encontrar algunos hongos cultivables en distintos ambientes, así como evaluar su capacidad para usar diversas fuentes de carbono en forma líquida; lo cual sería deseable si se requiere explotar su potencial biotecnológico.

#### IV. CONCLUSIONES

El método de goteo en placa es de resolución parecida al método de plaqueo, sin embargo, el método de goteo en placa es más rápido y económico para cuantificar células fúngicas como lo muestran los resultados de este trabajo. Los hongos se pueden cuantificar a partir de muestras de suelo o de medio líquido, no obstante podrían usarse otras fuentes para evaluar su número.

#### RECONOCIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de, PRODEP-2016 y VIEP-BUAP 2016. Jessie Hernández-Canseco fue becaria CONACYT y Guadalupe Ramos Castillo recibió beca VIEP-BUAP por lo que agradecemos a dichas instituciones.

#### REFERENCIAS

- [1] Cavalcante V. A., and Döbereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108, 23-31.

- [2] Chen C.-Y., Nace G. W., Irwin P. L. (2003). A 6X6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 475-479.
- [3] Corral-Lugo A., Morales-García Y. E., Pazos-Rojas L. A., Ramírez-Valverde A., Martínez-Contreras R. D., Muñoz-Rojas J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 173-182.
- [4] Couillerot O., Ramírez-Trujillo A., Walker V., von Felten A., Jansa J., Maurhofer M., Défago G., Prigent-Combaret C., Caballero-mellado J., and Moenne-loccoz Y. (2013). Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4639-4649.
- [5] Cuervo A. J. L., and Rivas P. G. G. (2007). Cuantificación de hongos micorrícicos en muestras de suelo en plantaciones de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora*. *NOVA Publicación Científica*, 5(7), 38-41.
- [6] Felderer B., Jansa J., and Schulin R. (2013). Interaction between root growth allocation and mycorrhizal fungi in soil with patchy P distribution. *Plant and Soil*, 373(1), 569-582.
- [7] Fuentes-Ramírez L. E., Caballero-Mellado J., Sepúlveda J., and Martínez-Romero E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(2), 117-128.
- [8] Herigstad B., Hamilton M., and Heersink J. (2001). How optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 121-129.
- [9] Hierro N., Esteve-Zarzoso B., González A., Mas A, Guillamon J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeast in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7148-7155.
- [10] Hoben H. J., and Somasegaran P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1246-1247.
- [11] Leyva-Madriral K. Y., Larralde-Corona C. P., Apodaca-Sánchez M. A., Quiroz-Figueroa F. R., Mexia-Bolaños P. A., Portillo-Valenzuela S., Ordaz-Ochoa J., Maldonado-Mendoza I. E. (2015). *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology*, 163, 486-497.
- [12] Marcial I. S. J., and Bernardette D. G. M. F. (2001). Correlación entre los contajes de microorganismos indicadores de la pimienta negra entera (*Piper Nigrum* L.) obtenidos por métodos de plaqueamiento convencional y en placas Petrifilm<sup>tm</sup>. *Anales Científicos*, 49, 137-155.
- [13] Okon Y. (1985). *Azospirillum* as a potencial inoculant for agricultura. *Trends in Biotechnology*, 3, 223-228.
- [14] Padey A., Palni L. M. S., and Bisht D. (2001). Dominant fungi in the rhizosphere of established tea bushes and their interaction with the dominant bacteria under *in situ* conditions. *Microbiological Research*, 156(4), 377-382.
- [15] Rodríguez-Andrade O., Fuentes-Ramírez L. E., Morales-Gracia Y. E., Molina-Romero D., Bustillos-Cristales M. R., Martínez-Contreras R. D., and Muñoz-Rojas J. (2015). The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in Split root experiments. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 335-343.
- [16] Tannous J., Atoui A., El Khoury A., Kantar S., Chdid N., Oswuald I. P., Puel O., and Lteif R. Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiology*, 50, 28-37.
- [17] Warham E. J., Butler L. D., and Suttom R. C. (1998). Ensayos para la semilla de maíz y trigo, Manual de Laboratorio. México: Editorial CIMMYT, 1-64.
- [18] Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Konemman E. W., Procop G. W., Schreckenberger P. C., and Woods G. L. (2008). Micología. En: Editorial Médica Pamericana. Koneman diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. 6a edición. Buenos Aires, Argentina, 1102-1134.

- [19] WHO (World Health Organization). (2008a). Microbial Aspects. En WHO library cataloguing-in-publication data. Guidelines for drinking-water quality. Third edition. Geneva, 143.
- [20] WHO (World Health Organization) (2008b). Surveillance. En WHO library cataloguing-in-publication data. Guidelines for drinking-water quality. Third edition. Geneva, 84-98.
- [21] Wuadisirisuk P., and Weaver R. W. (1985). Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. *Plant and Soil*, 87(2), 223-231.