

1. Título práctica de laboratorio:

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AGENTES MICÓTICOS

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Conocer las técnicas más empleadas para el aislamiento e identificación de levaduras y hongos filamentosos y sus aplicaciones en la microbiología.

Específicos:

- Diferenciar las estructuras morfológicas macroscópicas y microscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes.
- Aislar e identificar agentes micóticos a partir de muestras medioambientales y biológicas.
- Evaluar la capacidad antagónica y de control que se ejercen entre especies de hongos como mecanismos de control de crecimiento micótico.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Los hongos constituyen un reino propio y heterogéneo, constituido por organismos unicelulares microscópicos (levaduras) y organismos pluricelulares visibles a simple vista (setas) (1). Están conformados por células eucariotas, caracterizadas por tener una pared rica en quitina, no poseen flagelos, su metabolismo es heterótrofo y pueden tener reproducción sexual y asexual (2). De aproximadamente 90.000 especies existentes, menos de 200 se han reportado como patógenas en humanos (3). Los hongos son clasificados de manera general de acuerdo a su estructura y forma de reproducción en tres grandes grupos: Glomeromycota (Mucormicetos anteriormente zygomycetos), Ascomycota y Basidiomycota (Figura 1).

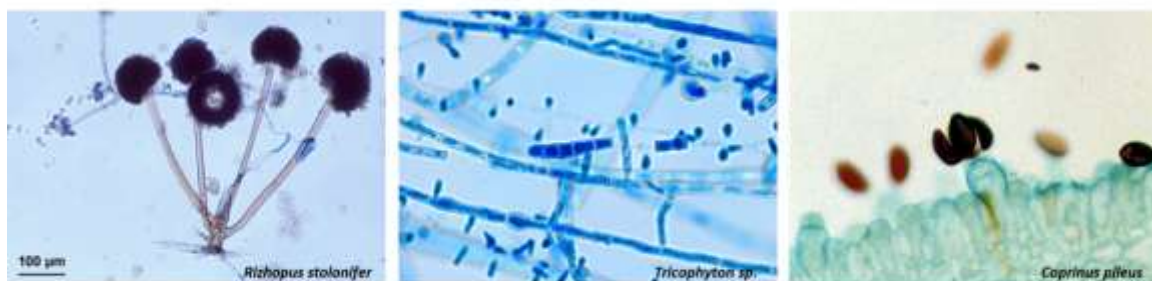


Figura 1. Microfotografías de especie representativa de los tres grupos de hongos. De derecha a izquierda: Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. Fuente: <https://i.pinimg.com/originals/9c/f4/f5/9cf4f5ea9d0587e5843608aa5674919d.gif>, http://3.bp.blogspot.com/-uNQkwV84kCw/UEltSV68yrl/AAAAAAAAHrQ/DkssIAGJzfg/s1600/15-+T_tonsurans+1000X.jpg, <https://www.bio.fsu.edu/~outlaw/Fungi1005L/lrg.Photos/BasidiumLrg.jpg>

En la naturaleza los hongos desempeñan un papel esencial en el procesamiento de la materia orgánica. A nivel industrial son empleados en la producción de quesos, pan, bebidas alcohólicas, producción de antibióticos, medicamentos inmunosupresores, entre otras aplicaciones. Desde el punto de vista patológico pueden ser agentes causales de grandes pérdidas en el campo de la agricultura. En el campo de la salud, pueden causar micosis en animales y humanos, generalmente oportunistas que pueden llegar a ser severas (1, 2).

Los hongos crecen bien en medios artificiales y en general tienen requerimientos simples. El medio de cultivo más empleado para su aislamiento e identificación es el agar Sabouraud, que contiene glucosa y peptona, con un pH ligeramente bajo que interfiere con el crecimiento bacteriano (1, 2). La mayoría de hongos de interés médico crecen en condiciones de aerobiosis, entre 25 y 30°C, con un tiempo de desarrollo que va desde los dos días hasta las tres semanas (1).

Para realizar un cultivo fúngico se debe tener en cuenta (2):

- Las muestras se ponen directamente sobre la superficie del medio de cultivo.
- Las vellosidades y escamas de piel se distribuyen por toda la superficie del agar.
- Los líquidos se deben dejar absorber en toda la superficie del agar antes de incubar.
- Las levaduras que se encuentren aisladas se siembran por agotamiento a modo bacteriano.

Un hongo se identifica como levaduriforme o filamentoso según el aspecto macroscópico de las colonias y por la observación microscópica (1):

- Levaduras: colonias húmedas, cremosas, compactas, similares a las bacterianas (Figura 2). Microscópicamente se observan como organismos unicelulares, donde con frecuencia se observan gemas producto de su proceso de división (Figura 3)



- Hongos filamentosos: colonias de aspecto algodonoso de formas colores y texturas variables (Figura 4). Microscópicamente se observan como organismos pluricelulares formando estructuras filamentosas (hifas), esporas asexuadas y estructuras que las producen (Figura 5).



Figura 2. Hongo levaduriforme. Típicas colonias de *M. globosa* en medio mDixon.
<http://www.actasdermo.org/es/la-pitiriasis-versicolor-las-levaduras/articulo/13129571/>

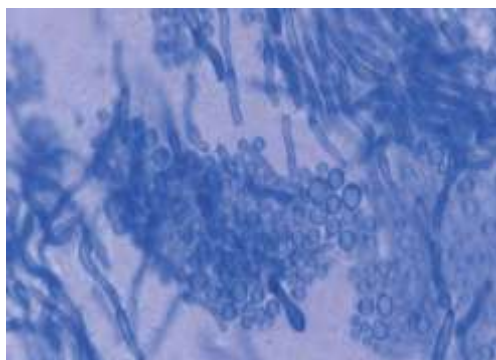


Figura 3. Hongo levaduriforme. Examen directo de pitiriasis versicolor en KOH + tinta,
<http://www.actasdermo.org/es/la-pitiriasis-versicolor-las-levaduras/articulo/13129571/>



Figura 4. Hongo Filamentoso *Penicillium* spp. sobre Agar sabouraud.
[4http://www.cram.com/flashcards/clinical-pathologymicro-4692621](http://www.cram.com/flashcards/clinical-pathologymicro-4692621)

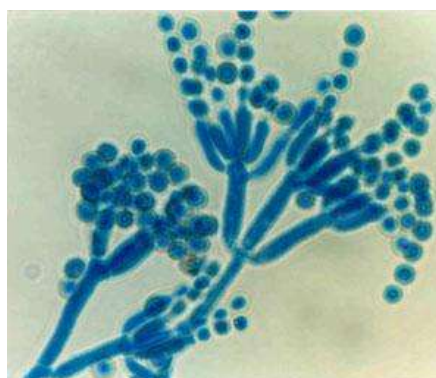


Figura 5. Hongo Filamentoso. *Penicillium* spp. Azul de lactofenol $\times 1.000$
<http://es.scribd.com/doc/239663976/Bases-Celulares-de-La-Vida-i#scribd>

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* y del género *Aspergillus* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo como *Fusarium*. En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos, pero el más estudiado es *Trichoderma*, debido a su fácil y rápido crecimiento además de sus características



de micoparasitar a otros hongos (4). Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros (5).

4. CONSULTA PREVIA

1. Dibuje la morfología microscópica de un hongo filamentosos y un hongo levaduriforme, describa las diferencias.
2. Escriba cuales son las diferencias entre los grupos: Glomeromycota Ascomycota y Basidiomycota. Dé tres ejemplos de especies representativas de cada uno.
3. Dibuje la morfología microscópica de un hongo Glomeromycota, señale y describa sus estructuras reproductivas.
4. ¿Para la toma de muestra de una posible micosis humana que preparación debe tener el paciente?
5. ¿Qué géneros de hongos ambientales pueden estar involucrados en procesos infecciosos humanos?
6. Mencione cinco micosis humanas importantes, describa y dibuje la estructura del microorganismo causal.
7. ¿Qué medios de cultivo se utilizan para hongos levaduriformes? Describa las condiciones medioambientales de crecimiento.
8. Describa el fundamento y realización de la prueba de KOH en hongos.
9. De tres ejemplos de hongos utilizados en control Biológico. Explique.
10. Defina los términos: competencia, micoparasitismo, antibiosis y crecimiento quimiotrófico.



5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES (Grupo 3 o 4 de estudiantes)	REACTIVOS (Grupo 25 estudiantes)	EQUIPOS (Grupo 25 estudiantes)
4 cajas de agar Sabouraud 2 cajas de agar PDA 2 tubos de tapa rosca estéril pequeños de 5mL 1 tubo de tapa rosca con agua destilada estéril pequeño de 5mL 1 bajalenguas 1 pipeta Pasteur 3 asas micológicas 1 Caja de <i>Fusarium</i> spp. 1 Caja de <i>Aspergillus</i> spp 1 Caja de <i>Trichoderma</i> spp.	1 frasco con 20ml de azul de Lactofenol 2% 20mL de KOH 40%	1 Baño serológico 1 microscopio 1 mechero
Materiales que debe traer el estudiante		
Elementos de bioseguridad Láminas portaobjeto Láminas cubreobjeto Toallas desechables Encendedor Lápiz de cera o marcador para vidrio Tijeras Cinta transparente delgada Muestra de agua Muestra de suelo		

6. PROCEDIMIENTO

Montaje

Detección directa de estructuras fúngicas en muestras humanas

Previo interrogatorio del paciente, donde cumpla las condiciones para la toma de muestra:

1. Hacer un raspado aséptico de la zona afectada, deben recolectarse escamas.
2. Depositar las escamas en un tubo estéril.
3. Adicionar al tubo 1mL de KOH al 20% ó 40%, o hasta que se cubran las escamas.
4. Deje en baño maría el tubo por aproximadamente 15 minutos.
5. Realizar un montaje en fresco.
6. Observar al microscopio en 10X, 20X y 40X.
7. Si desea puede hacer el montaje en lámina cubreobjetos y calentar al mechero. Dejar enfriar y observar.



Aislamiento de hongos contaminantes del aire

Para el aislamiento de hongos contaminantes del aire se empleará el método de sedimentación en placa. Este método consiste en dejar expuestas durante un tiempo determinado placas petri con un medio de cultivo selectivo.

1. Seleccionar el área a muestrear y rotular la placa con el nombre del área de muestreo.
2. Destapar la placa de petri de agar Sabouraud y dejarla abierta durante 15 minutos.
3. Cerrar la placa e incubar entre 25 y 30°C hasta la próxima sesión práctica.

Aislamiento de hongos contaminantes del agua

1. Seleccionar el punto de muestreo y rotular la placa con el nombre del área de muestreo.
2. Con ayuda de una pipeta Pasteur, tomar entre 5 y 10ml del agua y colocarlos dentro del tubo tapa rosca estéril.
3. Homogenizar la muestra recogida.
4. Sembrar una alícuota que cubra la superficie de la placa de agar Sabouraud.
5. Mover la caja circularmente para distribuir la muestra y permitir la absorción por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubar entre 25 y 30°C hasta la próxima sesión práctica.

Aislamiento de hongos contaminantes de la tierra

1. Seleccionar el punto de muestreo y rotular la placa con el nombre del área de muestreo.
2. Con ayuda de un bajalengua estéril, recolectar la tierra en un tubo tapa rosca que contiene 1mL de agua destilada estéril.
3. Mezclar vigorosamente.
4. Sembrar una alícuota que cubra la superficie de la placa de agar Sabouraud.
5. Mover la caja circularmente para distribuir la muestra y permitir la absorción por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubar entre 25 y 30°C hasta la próxima sesión práctica.

Aislamiento de hongos de muestras humanas

1. Tocar con su mano y uñas una placa de Agar sabouraud y rotular la placa con el nombre del área de muestreo.
2. Incubar entre 25 y 30°C hasta la próxima práctica.
3. Repita el mismo procedimiento si desea observar el crecimiento de hongos en otras partes.



Siembra de pruebas de antagonismo

1. Para corroborar la actividad antagónica de pares de hongos realice la siembra de dos hongos de su elección en cajas de PDA de la siguiente manera:
 - a. Caliente el asa recta y tome una muestra de la colonia del primer hongo seleccionado para la prueba de antagonismo y realice una única punción en el medio de cultivo de PDA en uno de los extremos de la caja.
 - b. De nuevo esterilice por calor el asa y tome una muestra del segundo hongo seleccionado para la prueba y realice una punción paralela al otro extremo de la misma caja donde sembró el primer hongo.
3. Lleve a incubación a 25°C durante 5 días.

Disponga las láminas utilizadas en el recipiente rotulado como “Descarte de láminas”

Lectura

Morfología macroscópica

Luego de la incubación, realizar el estudio macroscópico de las colonias aisladas teniendo en cuenta las siguientes características:

- Color en la superficie y en la base
- Textura
- Forma de los bordes
- Tamaño

Morfología microscópica

Tinción con azul de lactofenol: Tinción sencilla que permite visualizar las estructuras de los hongos y así identificar muchos de los géneros, aunque en ocasiones se puede alterar el ordenamiento característico de las esporas.

1. Colocar una gota de azul de lactofenol sobre una lámina portaobjetos.
2. Esterilizar el asa, permitir que se enfríe asépticamente.
3. Seleccionar un hongo que se encuentre aislado, extraer un fragmento.
4. Depositar el fragmento extraído sobre el portaobjetos con la gota de azul de lactofenol
5. Cubrir con un cubreobjetos, presionar suavemente para dispersar la gota.
6. Limpiar si hay azul de lactofenol fuera del cubreobjetos.
7. Observar al microscopio en 20X y 40X.



Preparación mediante impronta: Método rápido sencillo y que no altera la organización de las estructuras de reproducción.

1. Colocar una gota de azul de lactofenol sobre una lámina portaobjetos.
2. Cortar un trozo de cinta adhesiva, de unos 3cm.
3. Colocar la cinta sobre la superficie filamentosa del hongo, haciendo presión, ponga del centro hacia afuera del hongo para lograr recuperar mejores estructuras.
4. Colocar la cinta sobre la lámina, cubrir o no con un cubreobjetos.
5. Limpiar si hay azul de lactofenol fuera del cubreobjetos.
6. Observar al microscopio
7. Para las pruebas de antagonismo y usando una regla establezca el radio de crecimiento del hongo en cada caso usando como punto medio el sitio de la punción y extendiendo la regla hacia el centro el medio.

Disponga las láminas utilizadas en el recipiente rotulado como “Descarte de láminas”

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Prats, G. Microbiología y Parasitología Médicas. 1 ED. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 2013
2. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26 ED. New York. McGraw-Hill. 2013
3. Kanneth Ryan, George Ray, Sherris Medical Microbiology. 6 ED. New York. McGraw-Hill. 2014
4. Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal, 24(1), 14-21.
5. -Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández, L., & Encarnación, M. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de Aspergillus y Trichoderma hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista mexicana de micología, 26, 27-34.



INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0):

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete la siguiente tabla de resultados:

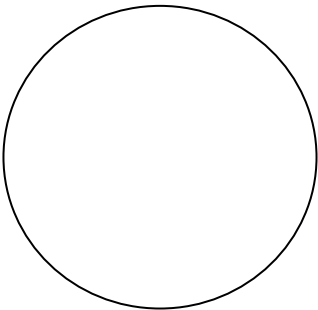
Tabla 1. Resultados observados.

Identificación de la muestra:							
Morfología Microscópica	Tinción con azul de lactofenol	Tipo de micelio		Color de micelio		Producción de conidias	Producción de Blastoconidias
		Septado	Aseptado	Hialino	Dematéaceo		
Morfología Macroscópica	Agar Sabouraud	Color		Forma	Consistencia	Presencia de micelio	Aspecto
		Anverso	Reverso				
Posible microorganismo identificado:							
Observaciones:							

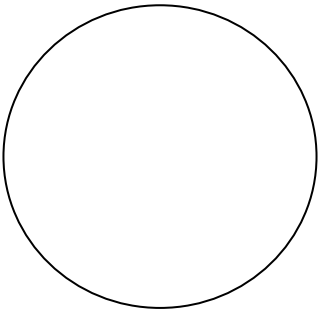
Identificación de la muestra:							
Morfología Microscópica	Tinción con azul de lactofenol	Tipo de micelio		Color de micelio		Producción de conidias	Producción de Blastoconidias
		Septado	Aseptado	Hialino	Dematéaceo		
Morfología Macroscópica	Agar Sabouraud	Color		Forma	Consistencia	Presencia de micelio	Aspecto
		Anverso	Reverso				
Posible microorganismo identificado:							
Observaciones:							

Tabla 2. Descripción microscópica. Dibuje tres estructuras características que observó en los montajes realizados y complete la tabla con la información relacionada a cada estructura.

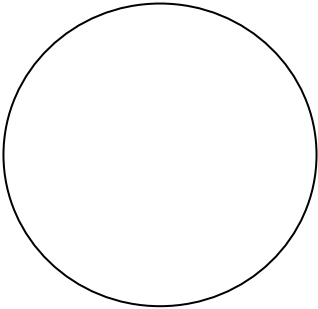
Estructura	
Colorante	
Aumento	
Objetivo	
Magnificación	
Origen	



Estructura	
Colorante	
Aumento	
Objetivo	
Magnificación	
Origen	



Estructura	
Colorante	
Aumento	
Objetivo	
Magnificación	
Origen	



DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.



En su análisis resuelva las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son las principales diferencias observadas entre un hongo filamentoso y un hongo levaduriforme? describa las diferencias, tanto macroscópicas como microscópicas.
2. ¿Cuáles son las características que permiten clasificar los hongos? ¿Cuáles observó usted en el laboratorio?
3. ¿Por qué se emplea el azul de lactofenol como coloración simple para visualizar las muestras fúngicas?
4. Indague sobre el proceso de inhibición de crecimiento micótico respecto de la prueba de antagonismo, revise bibliográficamente que sustancias y mecanismos están implicados en dicho proceso.

CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Organícelas de acuerdo a las normas VANCUOVER.