Práctica 6. Técnicas de cultivo de

actinomicetos y hongos

Unidad 3. Cultivo de bacterias y técnicas de siembra y

Unidad 4. Estudio microscópico y cultivo de hongos

## Objetivos

* Aplicar las diferentes técnicas de siembra para el cultivo y aislamiento de actinomicetos, y hongos levaduriformes y filamentosos.
* Distinguir las condiciones de crecimiento e incubación para el cultivo de actinobacterias y hongos.
* Diferenciar las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las actinobacterias y hongos.

## Introducción

Cada grupo microbiano presenta diversas características microscópicas y de desarrollo en medios líquidos, semisólidos y sólidos. En los últimos la formación de colonias visibles con características particulares permite diferenciar a los microorganismos, así como detectar contaminantes en los cultivos puros.

## Materiales

* Cultivos puros de bacterias:

*Streptomyces griseus*

*Streptomyces erythraeus*

* Cultivos puros de hongos levaduriformes:

*Saccharomyces cerevisiae*

*Rhodototula sp*

* Cultivos puros de hongos filamentosos:

*Penicillum sp*

*Aspergillus niger*

*Rhizopous sp*

*Alternaria sp*

*Fusarium sp*

* Material por equipo

1 Microscopio

2 mecheros

2 gradillas

2 asas bacteriológicas

2 asas micológicas

1 vaso de precipitados de 250mL

* Colorantes

Lactofenol azul de algodón

Azul de metileno para tinción simple

1 juego de colorantes de Gram

* Medios de cultivo

2 cajas con YPDM

4 cajas con Agar Sabouraud

1ª Sesión

*Cultivo de hongos y actinomicetos*

### Metodología

* Siembra de actinomicetos o bacterias filamentosas (dos bacterias diferentes por equipo)

1. Con una pipeta Pasteur estéril colocar en un extremo de la placa de YPDM dos gotas del cultivo de *Streptomyces griseus* o de *Streptomyces erythraeus.*
2. Esterilizar el asa y estriar el cultivo sobre el medio con la técnica de cuadrante radial.
3. Identificar las cajas de Petri con plumón indeleble o con etiquetas con los siguientes datos:

1515-09-# credencial

Nombre del microorganismo

dd/mm/aa

1. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a 28°C durante 3 a 7 días.

* Siembra de hongos levaduriformes (dos hongos levaduriformes diferentes por equipo)

1. Con el asa bacteriológica inocular una placa de Agar Sabouraud empleando la técnica de cuadrante radial con cada uno de los hongos levaduriformes.
2. Identificar las cajas de Petri con plumón indeleble o con etiquetas con los siguientes datos:

1515-09-# credencial

Nombre del microorganismo

dd/mm/aa

1. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a 28°C de 2 a 5 días.

* Siembra de hongos filamentosos (dos hongos filamentosos diferentes por equipo)

1. Identificar las cajas de Petri con plumón indeleble o con etiquetas con los siguientes datos:

1515-09-# credencial

Nombre del microorganismo

dd/mm/aa

1. Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar dentro de la zona aséptica.
2. Tomar una pequeña cantidad del cultivo del hongo seleccionado y sembrar en el centro de la placa de Agar Sabouraud, para ello presionar ligeramente el asa sobre la placa.
3. Sellar las cajas e invertirlas.
4. Incubar a 28°C de 5 a 7 días.

2ª Sesión

*Resultados del desarrollo de hongos y actinomicetos*

### Metodología

* Bacterias filamentosas

1. Revisar las características coloniales.
2. Preparar un frote y teñir con Gram.
3. Comparar la morfología colonial y microscópica de las bacterias estudiadas en la sesión anterior y la actual.
4. Registrar los resultados en el cuadro 1.

* Hongos levaduriformes

1. Revisar las características coloniales.
2. Realizar un frote y una tinción simple de cada una de las levaduras en estudio.
3. Comparar la morfología colonial y microscópica con las características de las bacterias.
4. Registrar los resultados en el cuadro 2. La descripción de las colonias debe hacerse de acuerdo con las características indicadas en el Manual de Microbiología General.

* Hongos filamentosos

1. Revisar las características coloniales.
2. Mediante la técnica de impronta con diurex, hacer una preparación en fresco y teñir, observar al microscopio con los objetivos 10x y 40x.
3. Registrar los resultados en el cuadro 3, para ello describir las características de los hongos con ayuda de los esquemas del Manual de Microbiología General.

* Preparación húmeda teñida de hongos filamentosos (técnica de impronta con diurex)

1. Cortar un pedazo de diurex de aproximadamente 1.5 cm.
2. Colocar una gota de lactofenol azul de algodón en un portaobjetos limpio y desengrasado.
3. Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar.
4. Colocar el diurex en el extremo del asa y presionar el diurex sobre el cultivo de hongo en caja cuidando de no frotar (figura 1).
5. Con ayuda del asa bacteriológica depositar el diurex (con la muestra hacia el colorante) en el portaobjetos (figura 2).
6. Agregar una gota de colorante sobre el diurex para evitar la formación de burbujas.
7. Colocar un cubreobjetos (figura 3).
8. Observar al microscopio con los objetivos 10x y 40x.

Asa micológica

Figura 1.

Figura 2.

Figura 3.

**10x**

**40x**

Diurex

Muestra

Colorante

Cubreobjetos

Colorante

Diurex con muestra

Colorante

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95 %.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
4. Los cultivos muestra deben ser esterilizados en autoclave, antes de ser desechados.
5. Después de observar las características de desarrollo, esterilizar los cultivos en autoclave.
6. Vaciar el agar sobre un papel y envolverlo.
7. Colocar el paquete en una bolsa de plástico y depositarla en el contenedor correspondiente.
8. Sellar las cajas de plástico con cultivos y depositarlas en el contendor rojo del laboratorio A.

Registro de resultados

* Cuadro 1. Características microscópicas y de crecimiento de bacterias filamentosas.

Nombre científico de la bacteria:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Características coloniales | Forma |  |
| Color |  |
| Elevación |  |
| Textura |  |
| Aspecto (seco, húmedo) |  |
| Características microscópicas | Forma |  |
| Otras estructuras |  |
| Gram |  |

* Cuadro 2. Características de crecimiento y microscópicas de un hongo levaduriforme.

Nombre científico:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Coloniales | Color |  |
| Aspecto superficial (liso, rugoso, cerebriforme) |  |
| Consistencia (cremosa, seca) |  |
| Microscópicas | Forma |  |
| Tamaño relativo con respecto a las bacterias |  |
| Presencia y distribución de blastosporas |  |

* Cuadro 3. Características de crecimiento y microscópicas de un hongo filamentoso

Nombre científico:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Coloniales | Desarrollo (escaso, medio, abundante) |  |
| Color |  |
| Aspecto del micelio superficial (algodonoso laxo, lanoso, aterciopelado) |  |
| Color del micelio profundo |  |
| Aspecto del micelio profundo (homogéneo, con anillos concéntricos, sectorial |  |
| Color |  |
| Microscópicas | Tipo de hifas (cenocítica, septada) |  |
| Tipo de cuerpo fructífero (esporangióforo, conidióforo) |  |
| De las esporas: |  |
| Morfología (esférica, oval, reniforme, fusiforme) |  |
| Color |  |
| Aspecto externo (lisas, punteadas, estriadas, verrugosas) |  |

Bibliografía complementaria

* Cappuccino, J. & Sherman, N., Microbiology: A laboratory manual, California. Benjamin Cummings, 2010.
* Leboffe Michael J. and Burton E. Pierce. 2006. Microbiology laboratory theory and application. 2nd edition, Morton Publishing Co. USA.
* Madigan M.T, Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H. and Stahl D.A., Brock Biology of microorganisms, 14th edition, UK, Benjamin Cummings, 2014.
* Prescott L.M., Harley J.P. and Klein G.A., Microbiología, 3a edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana, 2009.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, M. B., Velásquez, M. O., Vierna, L., Mejía C. A., Tsuzuki, R. G., Hernández G. L., Müggenburg, I., Camacho Cruz, A. y Urzúa H. M. del C., Manual de Prácticas de Microbiología General, México, UNAM, Facultad de Química, 2011.
* Tortora G.J., Funke B.R. and Case C.L., Microbiology: An Introduction with Mastering Microbiology, 11th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2012.

Cuestionario

1. ¿Qué son los actinomicetos? ¿Cuáles son sus características microscópicas y macroscópicas?
2. ¿Qué tipo de reproducción sexual presentan los hongos?
3. Esquematiza diferentes estructuras microscópicas de reproducción asexual en hongos microscópicos.
4. ¿En qué ambiente crecen los hongos?
5. ¿Cuáles son las condiciones de crecimiento de un hongo (temperatura y pH)?
6. ¿Qué es un hongo levaduriforme?

|  |  |
| --- | --- |
| YPMD. *Streptomyces griseus* | |
|  |  |
| Composición | g/L |
| Extracto de levadura | 3.0 |
| Peptona de carne | 5.0 |
| Extracto de malta | 3.0 |
| Glucosa | 10.0 |
| MgCl2.6H2O | 1.0 |
| MgCl2.6H2O | 1.0 |
| KH2PO4 | 0.3 |
| Agar | 15 |
| Agua destilada cbp | 1000 mL |
| pH | 7.0 |

Glosario de medios de cultivo

Investiga la formulación y preparación de los siguientes medios de cultivo:

* Agar Papa Dextrosa
* Agar Czapek
* Agar extracto de levadura, extracto de malta y glucosa
* Agar papa zanahoria
* Medio YPMD
* Agar Biggy

Glosario de microorganismos

*Streptomyces griseus*

*Streptomyces erythraeus*

*Candida albicas*

*Saccharomyces cerevisiae*

*Rhodototula sp*

*Penicillum sp*

*Aspergillus niger*

*Rhizopous sp*

*Alternaria sp*

*Fusarium sp*