



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRÁCTICA 4

“TINCIÓN DE HONGOS DE ALIMENTOS (TOMATE,
PAN) Y MEDIOS DE CULTIVO”

Guadalupe Soto Cepeda 281460

Sujej Alejandra Villalobos Pacheco 281459

Jaziel Alfredo Valerio Gutiérrez 271041

Giovana Ochoa Arreola 281543

Fecha de realización: 14 Noviembre 2014

Fecha de entrega: 28 Noviembre 2014

RESUMEN

Se realizó la presente práctica con el fin de observar en el microscopio las estructuras de los hongos contenidos en el pan y tomate, primero se desinfecto bien el área de trabajo con cloro 2% y alcohol al 70% se rocían las mesas y se limpia con sanitas después procedimos a lavarnos las manos. Para esta práctica en primer lugar realizamos la toma de muestra del hongo de cada alimento, con ayuda de un asa bien esterilizada, se enfriaba y se tomaba una generosa muestra de el hongo. Después esta muestra se colocaba en un portaobjetos que, antes, ya estaba preparado esterilizado con alcohol al 70%, en él se coloca una gota de agua destilada, esto con el fin de que nos ayude a que la muestra del hongo, se distribuya de manera correcta para que pueda ser observada mejor en el microscopio, después de colocar la muestra en el portaobjetos en forma de espiral se deja secar y se colocaba en una base para proceder a realizar la tinción de azul algodón de lactofenol. Esta tinción se realiza en los hongos, colocando encima de las muestras tomadas el colorante de azul algodón de lactofenol y dejando ahí por un minuto luego se enjuagaba el portaobjetos, los hongos que estuvieran presentes en el portaobjetos, al final se tiñen de color azul y es como los pudimos identificar en el microscopio de diferentes estructuras, hongos filamentosos con largas ramificaciones unidas y pequeños círculos.

INTRODUCCIÓN

En microbiología para la observación de diferentes tipos de hongos es muy importante el examen microscópico, por lo que se deben utilizar tinciones que logren preservar la integridad de las estructuras fúngicas. Es necesario observarlas con una alta calidad y contraste, para así, poder identificarlos de manera correcta, existen compuestos químicos, que permiten la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas. La tinción de azul algodón de lactofenol tiene características que hacen posible observar fácilmente la estructura de hongos filamentosos para así poder identificarlos. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa como mordiente, es decir, aumentan la afinidad de la célula por el colorante, esto cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación. Las estructuras filamentosas y circulares, se observarán de color azul sobre un fondo blanco, el hongo que podemos encontrar en el tomate es *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*) y en el pan *Rhizopus nigricans*.

OBJETIVO

La presente práctica se realizó con el propósito de aprender a tomar muestras de hongos con asas al rojo vivo, así como también observar la muestra de pan y tomate, en el microscopio de manera clara, de modo que las características de interés, es decir su estructura, seas descritas y fáciles de observar a distintas ampliaciones.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

- ❖ Alcohol 70%
- ❖ Sanitas
- ❖ Cloro 2%
- ❖ Pan con hongo
- ❖ Tomate con hongo
- ❖ Mecheros
- ❖ Asas
- ❖ Portaobjetos
- ❖ Agua destilada
- ❖ Pipeta
- ❖ Colorante azul algodón lactofenol
- ❖ Microscopio

Metodología:

Primeramente se desinfecto la mesa de trabajo, se roció cloro al 2%, sobre la superficie de la mesa limpiamos con sanitas dejamos secar y rociamos alcohol 70% y se deja secar, después de haber desinfectado apropiadamente el área de trabajo cada integrante procede a lavarse las manos durante 60 segundos con jabón neutro, se limpia con sanitas y se desecha a la basura.

Primero se comenzó preparando los materiales a utilizar, el pan con hongo, tomate con hongo (Figura 1), se prendieron los mecheros, colocamos asas cerca del área de trabajo, se limpiaron los portaobjetos donde colocaríamos la muestra con alcohol al 70% y por último el agua destilada y pipeta.

La toma de muestra de hongos debe realizarse siempre cerca de los mecheros para evitar cualquier contaminación. Primeramente procedíamos a desinfectar las asas completamente, calentándolas en los mecheros al rojo vivo (Figura 2), después estas asas deberían ser enfriadas en la parte del pan o tomate que no se encontrara con hongo (Figura 3), para poder tomar la muestra. Se debe colocar una pequeña gota de agua destilada en el portaobjetos tomando el agua destilada con una pipeta (Figura 4 y 5), para que la muestra pueda ser expandida correctamente, y con el asa ya enfriada inmediatamente se pasa a tomar una generosa muestra del hongo, que contiene el pan y el tomate (Figura 6). Esta misma muestra se coloca en el portaobjetos en forma de espiral, con ayuda de la gota de agua destilada (Figura 7), esto con el fin de que la muestra quede bien expandida(Figura 8), y se pueda observar de mejor manera en el microscopio.



Figura No. 1 “Pan integral y tomate, con hongos”.

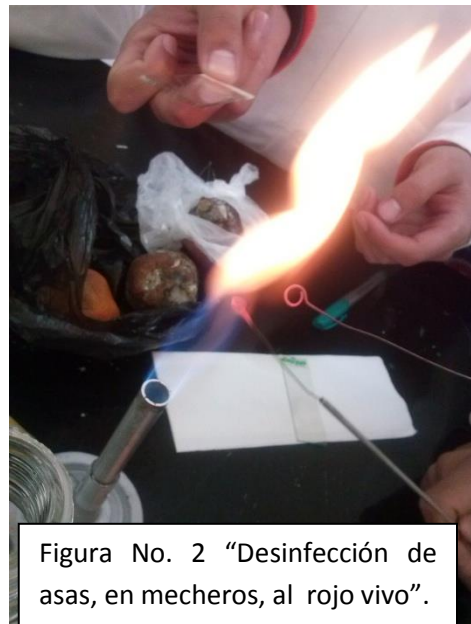


Figura No. 2 “Desinfección de asas, en mecheros, al rojo vivo”.



Figura No. 3 “Enfriamiento de las asas ya desinfectadas, en la parte del tomate donde no contiene hongo”.



Figura No. 4 “Tomando con la pipeta agua destilada para colocar una gota en el portaobjetos”.



Figura No. 5 “Pequeña gota de agua destilada, en el portaobjetos de muestra de tomate”.



Figura No. 6 “Tomando la muestra de hongo de tomate ya con el asa ya desinfectada y enfriada”.

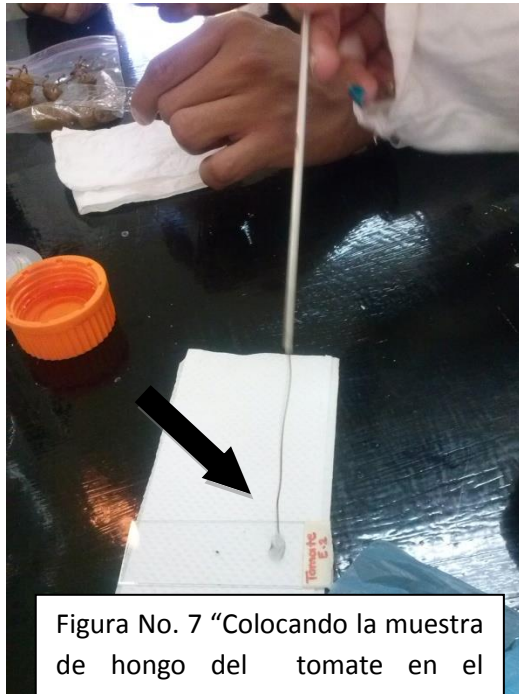


Figura No. 7 “Colocando la muestra de hongo del tomate en el portaobjetos forma espiral”.

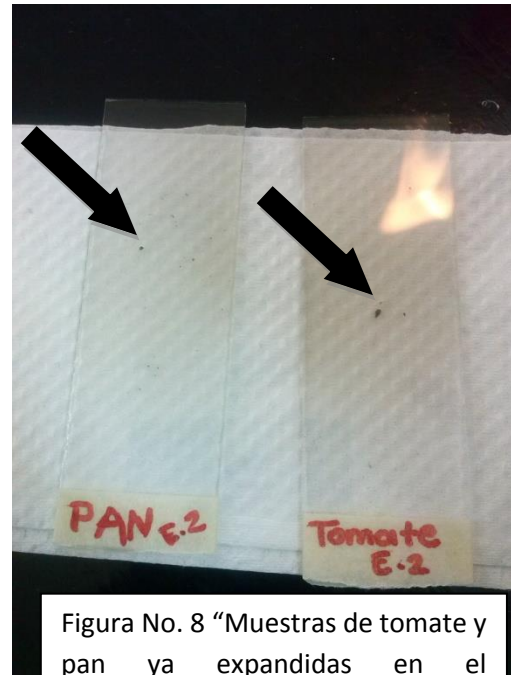


Figura No. 8 “Muestras de tomate y pan ya expandidas en el portaobjetos”.

Después de que ya teníamos listas las muestras en el portaobjetos pro seguimos a realizar la tinción con azul de algodón lactofenol para que los hongos presentes se tiñeran y pudieran ser observados en el microscopio. Las reacciones que tiene este colorante son tres, el fenol que destruye la flora acompañante, el ácido láctico que conserva la estructura fúngica y el azul de algodón que se adhiere a las hifas. Los pasos que se realizaron fueron los siguientes:

1. Se colocaron los portaobjetos con las muestras de hongo de pan y tomate en una base colocada de orilla a orilla en el área de lavado, (Figura 9).
2. Después añadimos colorante azul algodón de lactofenol en la muestra del pan y tomate, cubriéndolo totalmente, (Figura 10).

3. Dejamos secar por un minuto y proseguimos a enjuagar el portaobjetos en la llave con agua a presión baja, (Figura 11).
4. Pasamos los portaobjetos al microscopio y buscamos las estructuras de los hongos.



Figura No. 9 “Muestras de hongos en tomate y pan, colocada en la base para realizar la tinción con azul algodón de lactofenol”.



Figura No. 10 “Se coloca azul algodón de lactofenol, en las dos muestras, cubriéndolas totalmente y se deja por 1 minuto”.

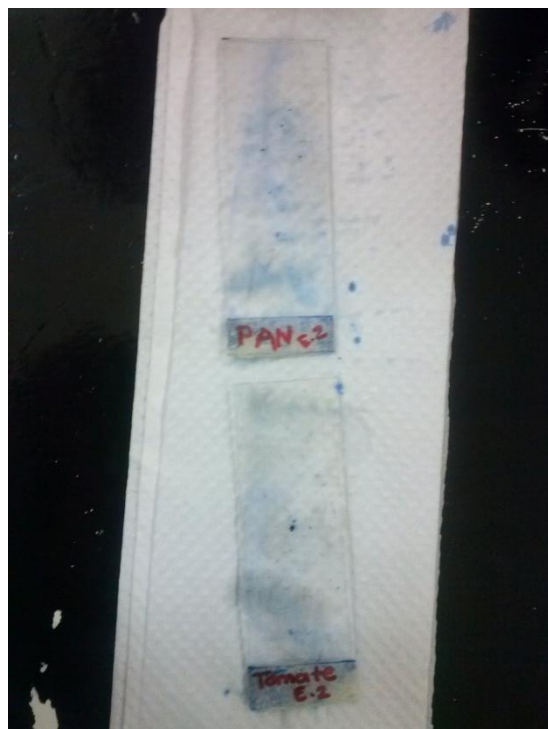


Figura No. 11 “Después de que paso 1 minuto se procede a enjuagar los portaobjetos con agua a presión baja para poder observar las estructuras en el microscopio”.

RESULTADOS

Con esta práctica se logro observar de manera clara y precisa la estructura de los hongos que contiene el pan integral y el tomate. Es muy diferente la estructura del moho del pan a simple vista, que cuando la observas en un microscopio, ahí se logró observar el micelio filamentoso ramificado, formado por abundantes cantidades de hifas (Figura 12). En el hongo del tomate se observaron, hifas en forma ovalada distribuidas lejos una de otras (Figura 13 Imagen derecha aumento de 10x), así como la conformación de cada una de ellas, se encontraron en forma ovalada y con distintas ramificaciones que salían de ellas (Figura 13 Imagen Izquierda aumento de 100x).

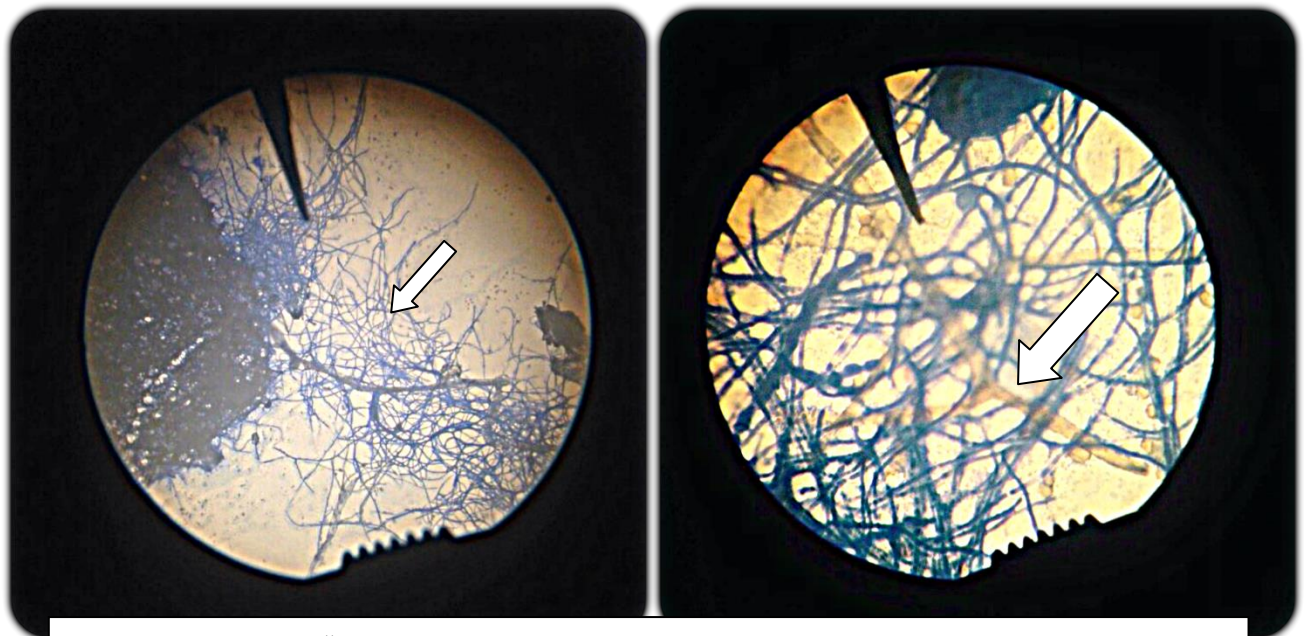


Figura No. 12 “Moho del pan integral observado en el microscopio, teñidos con azul algodón de lactofenol observados a aumento de 10x (Imagen Izquierda) y 100x (Imagen derecha)”.

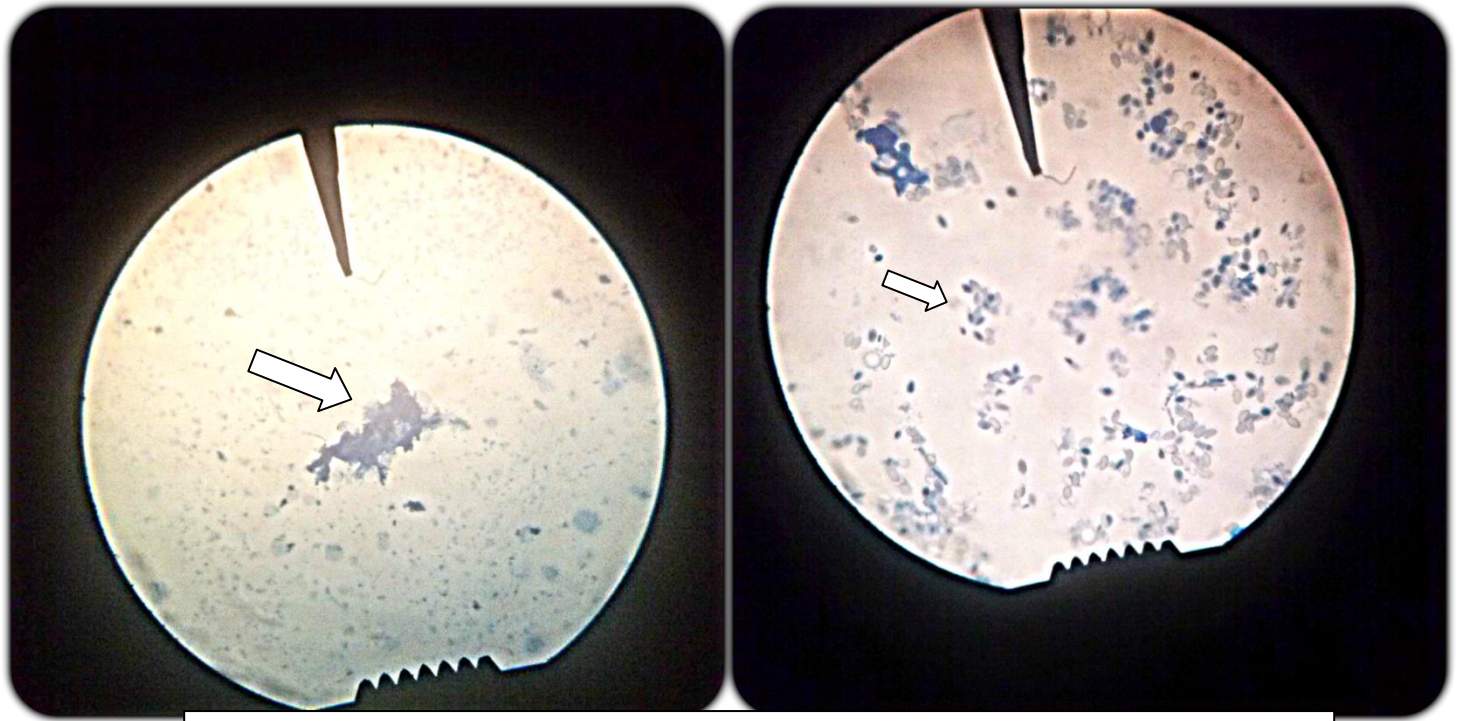


Figura No. 13 "Hongo encontrado en el tomate, teñido con azul algodón de lactofenol, vistas a aumentos de 10x (Imagen derecha) y 100x (Imagen Izquierda)".

CONCLUSIÓN

La toma de muestras de hongos debe realizarse en un ambiente totalmente esterilizado, se aprendió a preparar las muestras para después, poder aplicar la técnica de azul algodón de lactofenol, para realizar la tinción de hongos, la cual, es muy eficiente, ya que nos permite observar las estructuras filamentosas de manera clara y precisa. Es decir, en el moho de pan pudimos observar que se encuentran en conjunto las hifas ramificadas que conforman a los micelios y en el tomate se observan pequeñas estructuras distribuidas unas de otras en forma ovalada cada una.

BIBLIOGRAFÍA

- Laboratorio de infectología artículo de investigación Marzo 2014
<http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Artículo Laboratorio Microbiología por María Belén Huertas Chacón Octubre de 2013
<http://paratecnicosdelaboratorio.blogspot.mx/2014/10/tincion-azul-de-lactofenol-o-azul.html>