



Producción de láminas de hongos para la enseñanza

Production of fungi slides for teaching

Marcela Gómez Garzón^{*†}, Jeannette León Enciso[‡], Carlos Alberto Rodríguez Rodríguez[§]

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: el objetivo de esta investigación fue describir un método para la producción de láminas de hongos para ser usadas en docencia.

MÉTODOS: un total de 420 bloques de agar de 28 especies de hongos fueron producidos y se evaluaron tres colorantes: azul de lactofenol, azul vegetal y rojo vegetal.

RESULTADOS: la metodología empleada permitió la visualización de estructuras conidiógenas intactas para la mayoría de los hongos. Después de un año de almacenamiento el 96,1 % de las 420 láminas preparadas permanecieron en buen estado, tanto macroscópica como microscópicamente.

CONCLUSIONES: la metodología de producción de láminas implementada se consideró como innovadora, lo que permitirá facilitar el proceso de formación y optimizará la forma de enseñar la micología.

PALABRAS CLAVE: docencia, hongos, láminas.

* Fundación Universitaria Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina. Bogotá. Colombia.

† Contacto: mgomez@fucsalud.edu.co

‡ Fundación Universitaria Ciencias de la Salud, Facultad de Citohistología. Bogotá. Colombia.

§ Bacteriólogo. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Medicina. Bogotá. Colombia

Recepción: 17-04-2018. Aceptación: 19/06/2018

Cómo citar este artículo: Gómez-Garzón M, León-Enciso J, Rodríguez-Rodríguez CA. Producción de láminas de hongos para la enseñanza. Hechos Microbiol. 2018;9(1-2):9-16.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the aim of this research was to describe a method for producing fungi slides to be used in teaching.

METHODS: a total of 420 agar blocks of 28 different species of fungi were produced and three dyes were evaluated: lactophenol blue, and plant-derived blue and red.

RESULTS: the methodology allowed the visualization of intact conidiogenous structures in most fungi. After one year of storage, 96.1% of the 420 slides prepared were in good condition, both macroscopically and microscopically.

CONCLUSIONS: the implementation of fungi slides was considered an innovative methodology to facilitate the training process and optimize the way of teaching mycology.

KEYWORDS: teaching, fungi, slides.

INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivo de hongos sobre láminas fue descrita en 1946 por Johnson para asegurar el crecimiento de especies patógenas que crecen más lento que las especies de hongos contaminantes. Esto se lograba al utilizar un medio que estimulara la esporulación abundante y rápida del hongo y el agar seleccionado fue agar papa dextrosa (PDA). El montaje de láminas se propuso como una herramienta valiosa para la toma de fotomicrografías y especialmente útil para los propósitos de enseñanza.^{1,2}

El microcultivo de hongos es utilizado como método de identificación cuando las técnicas rápidas como la preparación en fresco por disección o el

montaje en cinta no permiten una visualización clara de estructuras propias del hongo que posibiliten su plena identificación.^{2,3} El método más utilizado fue descrito por Riddell⁴ en 1950, basado en colocar cortes cúbicos de agar en láminas ubicadas sobre varillas de vidrio, las cuales se inoculaban con partes de micelio en cada uno de los cuatro lados del agar, luego se cubrían con una laminilla y se incubaban en una cámara húmeda, que constaba de un trozo de papel filtro mojado con agua y glicerol en el fondo de una caja de Petri. Con este método se obtenían montajes con pocas alteraciones de las estructuras fúngicas.⁴

Woo en 2010 describió un método de microcultivo en bloques de agar sobre láminas y capacidad de almacenamiento a largo plazo, dado que muchos de los métodos descritos antiguamente no proporcionaban estabilidad del montaje ni visualización de estructuras incrustadas dentro del agar.⁵

En este artículo, se describe un método para preparar bloques de agar coloreados con tintes vegetales y azul de lactofenol, que permite la producción de material didáctico, de utilidad para estudiantes y docentes de la cátedra de Micología, gracias a su larga preservación y la presencia de estructuras fúngicas completas para el estudio de la conidiogénesis.

METODOLOGÍA

Un total de 28 hongos aislados de muestras clínicas y del ambiente, identificados y mantenidos en el cepario de Micología de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud fueron incluidos en el estudio. De estos nueve fueron hongos hialinos, nueve fueron hongos dematiáceos, siete fueron dermatofitos y tres fueron Mucorales (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los hongos utilizadas en este estudio⁶

Categoría	Especie Fúngica	Fuente	Rata de crecimiento	Días de Maduración
Mohos Hialinos no dermatofitos	<i>Acremonium</i> spp.	Clínico	Moderado-rápido	5-7
	<i>Aspergillus flavus</i>	Clínico	Rápido	3
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	Rápido	3
	<i>Aspergillus niger</i>	Ambiental	Rápido	3
	<i>Fusarium</i> spp.	Clínico	Rápido	4
	<i>Paecilomyces</i> spp.	Clínico	Rápido	3
	<i>Penicillium</i> spp.	Ambiental	Rápido	4
	<i>Trichoderma</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Verticillium</i> spp.	Ambiental	Rápido	4
Mohos Hialinos Dermatoftos	<i>Microsporum canis</i>	Clínico	Moderado	6-10
	<i>Microsporum gypseum</i>	Clínico	Moderado-rápido	6
	<i>Microsporum nanum</i>	Ambiental	Moderado	7
	<i>Trichophyton ajelloi</i>	Ambiental	Moderado	7
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Clínico	Moderado	7-10
	<i>Trichophyton rubrum</i>	Clínico	Moderado - lento	14
	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Clínico	Moderado - lento	12
Mohos Dematiaceos	<i>Alternaria</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Bipolaris</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Botrytis</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Exserohilum</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Nigrospora</i> spp.	Ambiental	Rápido	4
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Clínico	Rápido	3
	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Ambiental	Moderado-rápido	7
	<i>Stemphylium</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
	<i>Ulocladium</i> spp.	Ambiental	Rápido	5
Mohos Mucorales	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Ambiental	Rápido	4
	<i>Mucor</i> spp.	Ambiental	Rápido	4
	<i>Rhizopus</i> spp.	Ambiental	Rápido	4

Se probaron tres colorantes, solución de azul de lactofenol de Merck, colorante azul vegetal y colorante rojo vegetal de Levapan® (1 ml colorante vegetal, 10 ml ácido acético, 15 ml glicerina y 75 ml agua destilada esterilizada).

Para preparar los bloques de agar para el crecimiento de los hongos se utilizó un medio de cultivo transparente y pobre en nutrientes utilizado para la detección de especies de *Acanthamoeba* en muestras oftalmológicas (Agar *Acanthamoeba* de Merck) y que contenía NaCl 12 %, MgSO₄·7H₂O 4 %, Na₂HPO₄ 14,2 % y CaCl₂·2H₂O.

Los hongos fueron sembrados por punción en cinco puntos de la caja de agar *Acanthamoeba* en cabina de seguridad biológica clase II. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente. Se realizó revisión diaria del crecimiento microscópicamente bajo 5X, se chequeó la formación de micelio y de conidias hasta el día 15 para los dermatofitos. Al observar las estructuras de reproducción en cantidad abundante para cada hongo, se realizó un corte del agar con bisturí estéril para obtener un bloque de agar de 1,5 cm, teniendo como centro el punto del inóculo inicial del hongo.

El bloque de agar se ubicó sobre una lámina que tenía previamente una gota de colorante y se colocó una segunda gota de colorante sobre el bloque de agar para finalmente cubrirlo con una laminilla. Los montajes se llevaron a deshidratación a temperatura ambiente en una bandeja plana y se cubrieron con papel vinipel para evitar contaminación, hasta obtener un grosor del bloque de agar de 1 mm, usualmente por 48 h. El montaje fue sellado por todos los bordes con resina para asegurar el almacenaje a largo plazo.

Para cada coloración se procesaron cinco láminas por hongo y se diseñó un formato de evaluación de la calidad de los montajes, en el que se calificó de 0 a 5 la calidad de cada montaje. Los criterios fueron: facilidad de visualizar el hongo, calidad de la tinción de las hifas y de las estructuras conidiógenas completas del hongo. Se determinó el comportamiento de cada coloración para cada grupo de hongos de acuerdo al porcentaje total generado. Estas evaluaciones se rea-

lizaron en la semana 1 y 2, en el mes 1, 3 y 6, y al año de realizarse los montajes.

Se generó una hoja Excel y se analizaron los datos en Stata13. Se realizó análisis univariado con determinación de frecuencias. Se realizó un video demostrativo para explicar la metodología, el cual puede ser consultado en http://youtu.be/wplgKO_x4Wk

RESULTADOS

Un total de 420 bloques de agar con las 28 especies de hongos y con tasas de crecimiento diferentes fueron preparados (Tabla 1);⁶ se evaluaron 140 láminas para cada coloración. El proceso fue sencillo, de bajo costo y reproducible. Los montajes permitieron observar en detalle las estructuras fúngicas importantes para su identificación (Fig. 1).

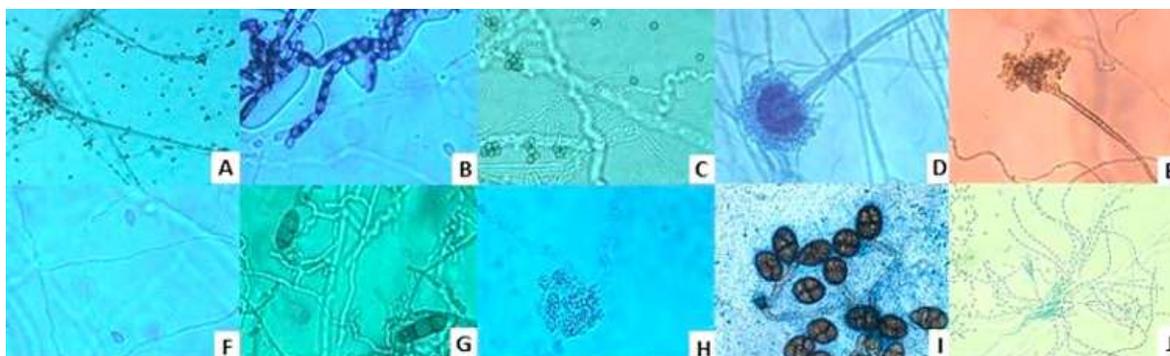


Figura 1. A: *Rhizopus* spp. B: *Neoscytalidium dimidiatum*. C: *Trichoderma* spp. D: *Aspergillus flavus*. E: *Cladophialophora carrionii*. F: *Scedosporium*. G: *Exserohilum* spp. H: *Botrytis* spp. I: *Epicoccum* spp. J: *Paecilomyces* spp

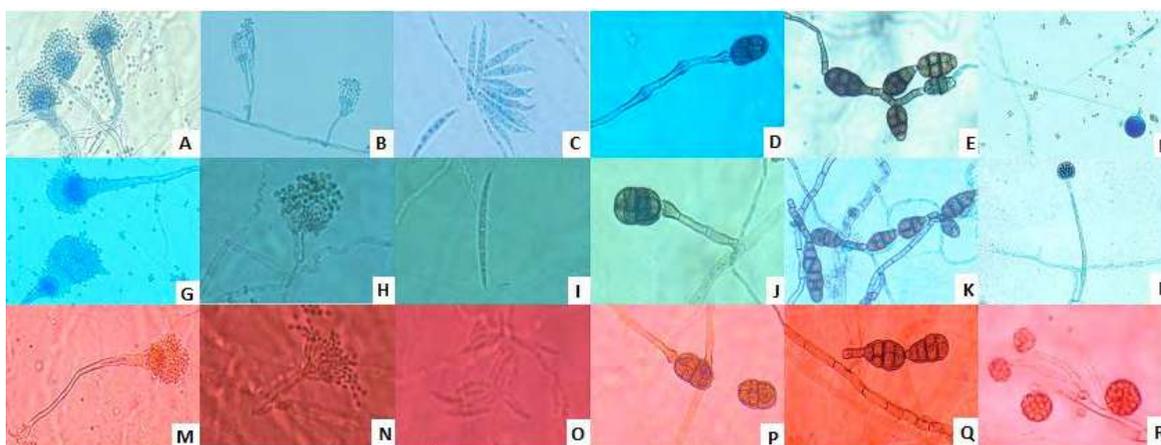


Figura 2. Comparación microscópica de los colorantes Azul de Lactofenol (A-F), Azul vegetal (G-L) y Rojo Vegetal (M-R). *Aspergillus fumigatus*: A, G, M; *Penicillium* spp.: B, H, N; *Fusarium* spp.: C, I, O; *Stemphylium* spp.: D, J, P; *Alternaria* spp.: E, K, Q; *Mucor* spp.: F, L, R

El crecimiento de los hongos se originó desde el punto de inoculación primaria y se fue irradiando hacia afuera, por esta razón fue importante tener como centro de corte del bloque de agar el punto de inoculación. Gracias a la característica de transparencia del medio se determinó microscópicamente el momento de abundante reproducción para realizar los cortes de agar sin generar contaminación del cultivo, los tiempos de maduración fueron entre 7 y 17 días, dependiendo del hongo.

En hongos hialinos se logró diferenciar los micelios septados de los cenocíticos con la coloración de azul de lactofenol (Fig. 1: F, H, J), con los colorantes azul y rojo vegetal la identificación de los septos fue difícil (Fig. 1: A, C, D). En hongos dematiáceos los septos se identificaron muy bien con colorante rojo vegetal y azul de lactofenol (Fig. 1: B, E, I).

Se identificaron fácilmente las estructuras de reproducción, como las esporangiosporas, microconidias, macroconidias y artroconidias con las tres coloraciones. La técnica permitió observar conidióforos intactos y estructuras que normalmente se destruyen en los montajes con agujas o cinta, como es la célula pie de *Aspergillus* (Figura 1: D) o cadenas de conidias unidas a las fiálides de *Paecilomyces* spp. (Figura 1: J), *Cladophialophora carrioni* (Figura 1: E) y *Penicillium* spp (Fig. 2 B,H y N).

Los porcentajes de evaluación para cada coloración son presentados en la tabla 2. Para los montajes de hongos hialinos se obtuvo un porcentaje del 87,5 %, para los colorantes azul de lactofenol y azul vegetal, se observó que el micelio tomó el tinte, así como las estructuras de reproducción tipo conidióforos, vesículas, métulas, fiálides y conidias de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., las macroconidias de *Fusarium* spp. y las

conidias en racimo típicas de *Trichoderma* spp. se identificaron fácilmente. En las preparaciones con rojo vegetal algunas estructuras fueron difíciles de visualizar con un 66,7 % (Fig. 2).

El grupo de dermatofitos evaluado presentó el porcentaje más bajo (50 % con rojo vegetal), siendo difícil la visualización de estructuras especiales como las hifas en espiral y la organización de las microconidias. Las macroconidias fueron identificadas unidas al micelio y fue posible contar el número de lóculos con azul de lactofenol (Fig. 1 H) y azul vegetal.

El mejor comportamiento de las coloraciones se presentó con los hongos dematiáceos con un 100 % para los tres tipos de colorante, dado que el pigmento oscuro de melanina generó un buen contraste para la observación e identificación de estructuras micóticas como micelio, conidióforos y conidias de *Alternaria* spp. y *Ulocladium* spp. (Fig. 2).

Para los Mucorales se observó una buena calidad de tinción con los tres colorantes con un 83,3 % para la tinción con azul de lactofenol y azul vegetal y un 66,6 % para el rojo vegetal en la totalidad de láminas (Fig. 2). Se presentó dificultad en la realización del montaje por el micelio aéreo extenso formado y al momento de colocar el cubreobjetos se dañaron las estructuras aéreas reproductivas características de este tipo de hongos.

Las láminas obtenidas por esta metodología se revisaron macroscópica y microscópicamente un año después de preparadas y el 96,1 % permanecieron en buen estado (Fig. 3). Las láminas en mal estado correspondieron a 5 de dermatofitos con azul vegetal, 5 de dermatofitos con rojo vegetal y 6 de Mucorales con azul vegetal.

Tabla 2. Porcentajes de evaluación de las coloraciones azul de lactofenol, azul vegetal y rojo vegetal para los diferentes grupos de hongos

Categoría	Azul de lactofenol	Azul vegetal	Rojo vegetal
Hialinos no dermatofitos	87,5 %	87,5 %	66,7 %
Hialinos Dermatofitos	83,3 %	83,3 %	50 %
Dematiáceos	100 %	100 %	100 %
Mucorales	83,3 %	83,3 %	66,6 %



Figura 3. Comparación del estado de las láminas producidas tiempo cero y 1 año

DISCUSIÓN

En las últimas décadas la incidencia de las micosis ha aumentado y su diagnóstico se basa en la correcta identificación microscópica de los hongos. La enorme cantidad de hongos patógenos dificulta su enseñanza durante el curso de micología, principalmente por no tener acceso a todas las especies para realizar cultivos. Por esta razón es necesario aplicar nuevos enfoques y estrategias a los sistemas de educación que permitan la transformación de la enseñanza y el aprendizaje.

La identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de estructuras especializadas de reproducción asexual. Esto se logra por la preparación de láminas por la técnica de disgregación, que generalmente desintegra las estructuras. Otra forma es utilizar el método de Porto (cinta adhesiva transparente), que permitirá observar intactas las estructuras, pero la preparación debe ser observada inmediatamente y no permite su almacenamiento. Infortunadamente las láminas obtenidas por este método no se mantienen por más de 15 minutos y por consiguiente no pueden ser usadas con fines de docencia.⁷

Woo et al.⁵, propusieron la preparación de bloques de agar, trabajaron inicialmente con diferentes medios de transporte, agar Sabouraud dextrosa, medio de ho-

jas de clavel y agar *Acanthamoeba*; el trabajo preliminar mostró que el medio de *Acanthamoeba* era el mejor para promover la conidiogénesis de la mayoría de los mohos debido a su nivel extremadamente bajo en nutrientes. En 2010, preservaron 510 láminas de 137 especies de hongos empleando este medio.⁵ En el presente estudio, el agar *Acanthamoeba* nos permitió el crecimiento de las 28 especies de hongos, su baja concentración de agar (1,5 %) permitió que el desarrollo de las estructuras de los hongos se diera dentro del agar y no en la superficie como en la mayoría de crecimientos en placa de agar. Los tiempos de maduración de los hongos fueron más largos que los propuestos por Larone⁶ (Tabla 1). Para los dermatofitos de crecimiento lento, se requirió un tiempo de incubación más largo para la formación de esporas, por ejemplo, las macroconidias de *Microsporum canis* se comenzaron a observar en el día 15 y solo hasta el día 20 su cantidad era abundante para realizar los bloques de agar. Se comprueba que el medio aporta los nutrientes básicos como sales, proteínas y agua para permitir el crecimiento y esporulación de diferentes especies de hongos.

Adicionalmente los bloques se deshidrataron rápidamente (48 h), favoreciendo que el colorante no se desecara antes de ser sellado con la resina.

La metodología empleada permitió la visualización de estructuras conidiógenas intactas para la mayoría de los hongos. Se utilizó el colorante Azul de Lactofenol, colorante de uso general en micología, y que actúa como agente aclarante por la acción combinada del fenol y el ácido láctico, mientras que el colorante Azul de algodón se une a la quitina de las paredes celulares de los hongos, que quedan teñidas de azul oscuro.⁸ Adicionalmente, se evaluaron dos tintes utilizados en la industria alimenticia para buscar una alternativa al uso habitual del azul de lactofenol, colorante que contiene fenol, un químico que puede causar problemas por contacto directo y daños crónicos por exposición repetitiva.⁹ Además se debe tener un control especial para la eliminación de residuos y productos a base de fenol que debe ser realizado por un gestor autorizado.¹⁰ En el Convenio de Basilea, en su Anexo VIII lista A, la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) y en la Resolución del Consejo de la Unión Europea (CEE, por sus siglas en inglés)

se incluyen los compuestos fenólicos contaminantes prioritarios en función de su frecuencia de aparición, toxicidad y persistencia.¹¹

González et al. en 2011 evaluaron dos colorantes de origen vegetal que contienen grupos cromóforos los cuales poseen la propiedad de colorear las superficies a las cuales son sometidas y grupos auxocromos que intensifican el color.¹ La tinción con los colorantes vegetales empleados en este estudio presentó buenos resultados en los montajes realizados para los diferentes grupos de hongos. Con el rojo vegetal se obtuvo un buen contraste para los hongos pigmentados permitiendo obtener montajes de excelente calidad, pero se dificultó la visualización de hongos hialinos por la intensidad del color rojo que interfería con la identificación de las estructuras representativas (Fig. 2). El azul vegetal mostró ser de gran utilidad en la realización de los montajes de todo tipo de hongos, tanto hialinos como pigmentados dado que permitió contrastar la tonalidad del montaje y su color azul-verdoso resultó agradable a la hora de la visualización al microscopio.

Se evaluaron hongos representativos que incluyeron hialinos, dematiáceos, dermatofitos y Mucorales de fácil crecimiento y que no requerían nutrientes especiales; no obstante, dentro del grupo de dermatofitos se presentaron dificultades para visualizar las microconidias de *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* y *T. tonsurans* con las tres coloraciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio con los colorantes vegetales y el azul de lactofenol, se recomienda la utilización del azul vegetal para la realización de microcultivos de hongos, porque su calidad fue igual a la del azul de lactofenol que es el colorante estándar para colorear las láminas de hongos. El colorante azul vegetal es de tipo sintético y no perjudicial para el operador que realiza estos procedimientos, y además es amigable con el medio ambiente.

Después de 1 año de almacenamiento, 404 (96,1 %) de los 420 bloques preparados permanecieron en buen estado. En la figura 3 se muestra un montaje a tiempo cero y al año de su preparación. Woo et al.⁵ en su trabajo reportan que las láminas perduran hasta 3 años en buen estado. Microscópicamente se observó que las estructuras permanecieron intactas, así como la calidad de la coloración. El problema más grave que

afectó la calidad de las preparaciones fue la fuga de aire a través del medio de montaje, con la consecuente formación de burbujas de aire afectando el secado de los montajes, poniendo en peligro las estructuras de los hongos. Otro problema fue la decoloración de las tinciones vegetales con formación de manchas que no permitían la visualización de las estructuras.

CONCLUSIONES

El largo periodo de preservación y el uso constante de las láminas en los laboratorios de docencia, permite recomendar esta metodología. Los autores consideran esta metodología de producción de láminas como innovadora, lo que permitirá facilitar el proceso de formación y optimizará la forma de enseñar la micología.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los integrantes de los grupos de investigación GRIMIC y C&T por sus valiosos consejos.

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto DI-I-0476-12 financiado por Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Colombia.

REFERENCIAS

1. **González MS, Diamont PD, Gutiérrez B.** Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante. *Bioagro*. 2011;23:65-8.
2. **Johnson EA.** An Improved Slide Culture Technique for the Study and Identification of Pathogenic Fungi. *J Bacteriol*. 1946;51(6):689-94.
3. **Koneman EW, Koneman AS.** Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2008.
4. **Booth C.** *Methods in Microbiology*. Londres: Elsevier Science; 1971.
5. **Woo PC, Ngan AH, Chui HK, Lau SK, Yuen KY.** Agar block smear preparation: a novel method of slide preparation for preservation of native fungal structures for microscopic examination and long-term storage. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3053-61.

6. **Larone DH.** Medically Important Fungi: A Guide to Identification. Washington: American Society for Microbiology; 2002.
7. **Hughes AD, Lorusso GD, Greer DL.** The 'double-layer tape prep': an improvement to a standard technique. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 5):45.
8. **Bonifaz A.** Micología médica básica. 3.ª ed. México: McGraw Hill; 2010.
9. **Morán I.** Toxicología clínica. España: Grupo Difusión; 2011.
10. **Mora C, Berbeo M.** Manual de Gestión Integral de Residuos. [Internet]. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2010. [Consultado 2018 Feb 05]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-gestion-integral-residuos.pdf>
11. **Agency for Toxic Substances & Disease Registry.** Toxicological profile for Phenol. [Internet]. 2008. [Consultado 2018 Feb 05]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=148&tid=27>