CAPILLA ALFO

CAPÍTULO 14

METODOS PARA EL AISLAMIENTO Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE HONGOS

Cultivo y aislamiento

Con las debidas precauciones de higiene, tomar una muestra de las lesiones del pez de donde se sospecha la presencia de hongos, suspenderla en 5 ml. de agua destilada estéril y verter en una placa Petri.

Agregar semillas de lino, cáñamo, maíz o trigo previamente esterilizadas o hervidas en agua durante 10-15 minutos. Incubar a 18-20°C durante 5-10 días.

En condiciones asépticas lavar las semillas en agua estéril con el objeto de eliminar posibles bacterias. Con una asa bacteriológica tomar parte del material fúngico que se desarrolló en la superficie de las semillas y sembrar por estría cruzada en placas Petri con agar harina de maíz y agar Sabouraud dextrosa. Incubar a 18-20°C durante 5-10 días. Si no se logran obtener colonias aisladas, hacer subcultivos en los mismos medios de cultivo e incubar en las condiciones antes mencionadas. Si se desean obtener cultivos puros a partir de una espora, se deberá utilizar un microscopio y con la ayuda de agujas estériles tomar una espora y transferirla a una placa Petri con agar Sabouraud dextrosa o agar harina de maíz e incubar a 18-20°C durante 5-10 días.

De los hongos aislados pueden elaborarse microcultivos o bien, hacer observaciones directas entre porta y cubreobjetos, preparaciones fijadas con una mezcla de etanol y formalina o montajes con lactofenol-azul de algodón.

El género del hongo se determina por la forma y estructura de las hifas y esporas. Además de *Saprolegnia;* pueden cultivarse por este método otros hongos tales como *Achlya* sp., *Aphanomyces* sp., *Pythium* sp., etc.

Observación de los hongos

a) Microcultivo

Depositar en el centro de un portaobjetos estéril una gota de agar Sabouraud dextrosa estéril y fundido. Homogeneizar con la gota de medio una parte de la colonia de hongo que fue retirada de la placa Petri con asa bacteriológica y colocar inmediatamente encima un cubreobjetos estéril, haciendo una ligera presión entre porta y cubreobjetos. Sellar tres lados del cubreobjetos con parafina, dejando uno libre para el acceso de oxígeno. Incubar a 18-20°C/5 días en atmósfera húmeda. Observar al microscopio.

b) Observación directa

Homogeneizar un poco de material fúngico con una gota de solución salina sobre un portaobjetos, colocar encima un cubreobjetos y observar al microscopio.

c) Fijación en alcohol-formalina

Suspender material fúngico en 1 ml de una mezcla de etanol al 70% (94 partes) y formalina al 40% (6 partes). Colocar una gota entre porta y cubreobjetos, sellar con vaselina y observar al microscopio.

d) Montaje con lactofenol-azul de algodón

Colocar sobre un portaobjetos una gota de reactivo lactofenol-azul de algodón; suspender material fúngico en el reactivo y si es necesario disociar con aguja. Una vez que el material esté homogeneizado, calentar sobre el mechero hasta que aparezcan burbujas, dejar enfriar. Colocar encima un cubreobjetos, sellar con vaselina y observar al microscopio.

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Agar con harina de maíz

Harina de maíz	40.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

Hervir a fuego lento la harina de maíz con agua durante una hora. Filtrar a través de gasa. Medir y completar a 1000 ml. con agua destilada. Agregar el agar y disolver en baño maría. Filtrar sobre dos capas de algodón y gasa, esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Agar Sabouraud dextrosa

Peptona	10.0 g
Glucosa	40.0 g
Agar	18.0 g
Agua	1000 ml

Lactofenol-azul de algodón

Cristales de fenol	20 g
Acido láctico	20 g
Glicerina	40 g
Agua destilada	20 ml

Disolver por calentamiento suave en baño de agua. Añadir 0.05 g. de azul de algodón.

Fijador de etanol-formalina

Solución A

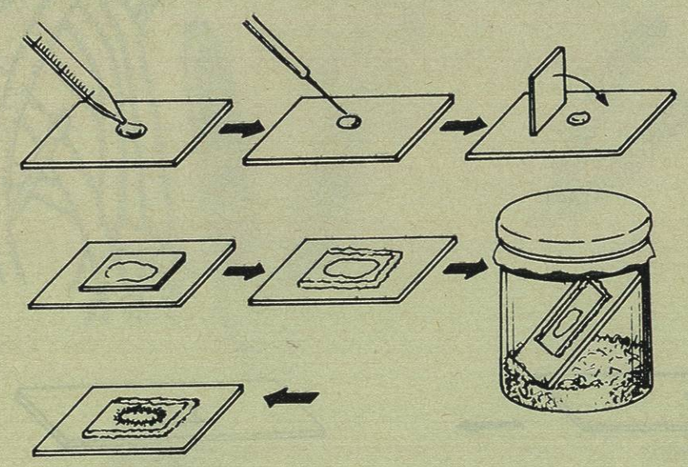
Etanol	70 ml
Agua destilada	30 ml

Solución B

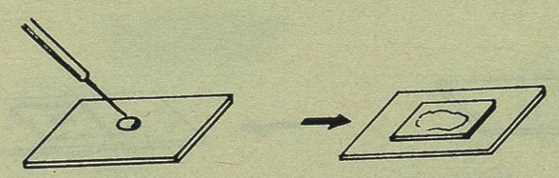
Formalina	40 ml
Agua destilada	60 ml

Mezclar 94 ml de solución A con 6 ml de solución B.

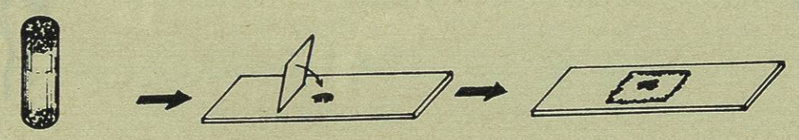
CAPILLA ALFONSINA



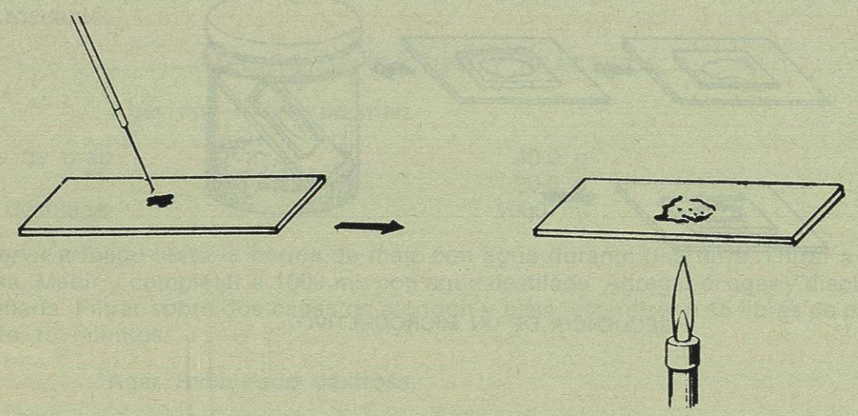
SECUENCIA DE UN MICROCULTIVO

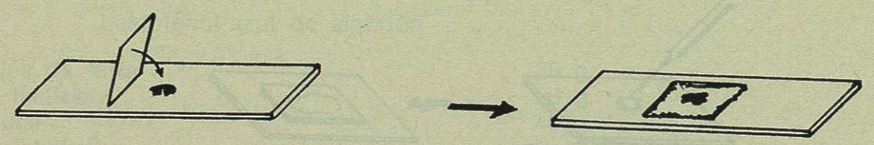


Observación directa entre porta y cubreobjetos

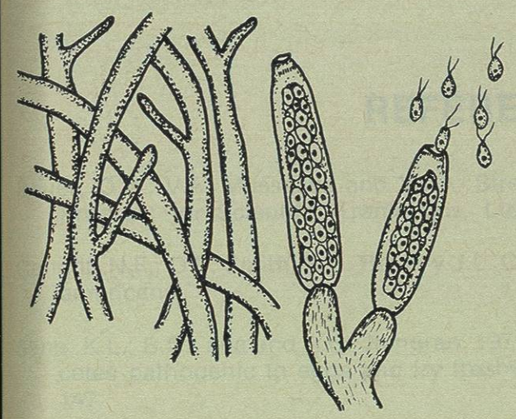


Fijación en alcohol formalina

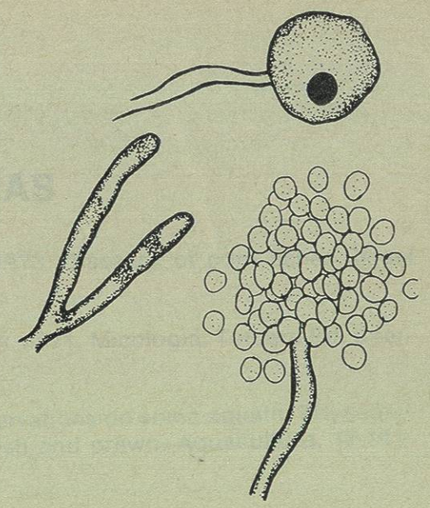




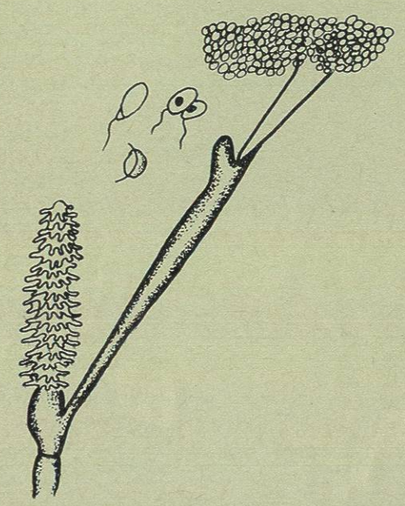
Montaje con lactofenol-azul de algodón



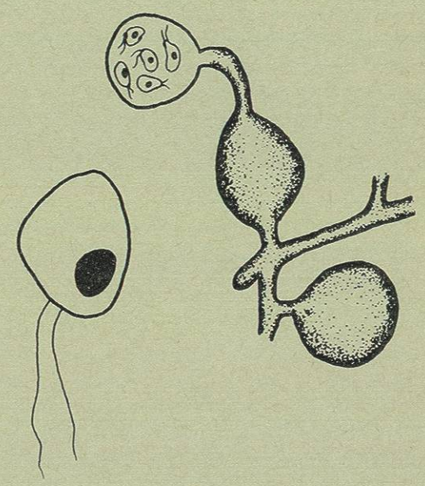
Saprolegnia sp



Aphanomyces sp



Achlya sp



Pythium sp

CAPILLA ALFONSINA

REFERENCIAS

Bauer, O.N.; V.A. Musselius and Yu A. Strelkov. 1973. Diseases of ponf fishes. Israel Program for Scientific Tranlations. Ltd:177.

Canant, N.F.; D.T. Smith; R.D. Baker y J.L. Callaway. 1971. Micología. Tercera Ed. Interamericana.

Sanh, K.L.; B.C.; Jha and A.G. Jhingran. 1977. Observations on some aquatic Phycomycetes pathogenic to eggs and fry freshwater fish and prawn. Aquaculture. 12:141-147.

Verna, L.C. y F.J. Herrero. 1952. Micología. Primera edición. Ed. El Ateneo, Buenos Aires:504-506.