

DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO, VIABILIDAD Y MANTENIMIENTO DE HONGOS NEMATÓFAGOS

Presentado por:

Laura Paola Guzmán Torres

Lina Paola Gómez Mendivelso

Nicolas Garay Urbina

Asesor interno:

Ligia Consuelo Sánchez

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
Bogotá D.C.



INTRODUCCIÓN

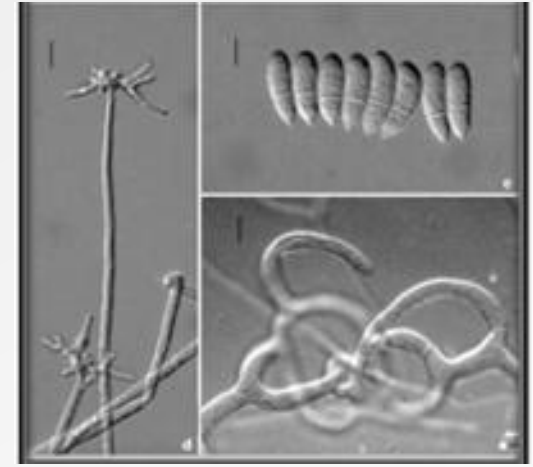
Consistencia

Medios de cultivo

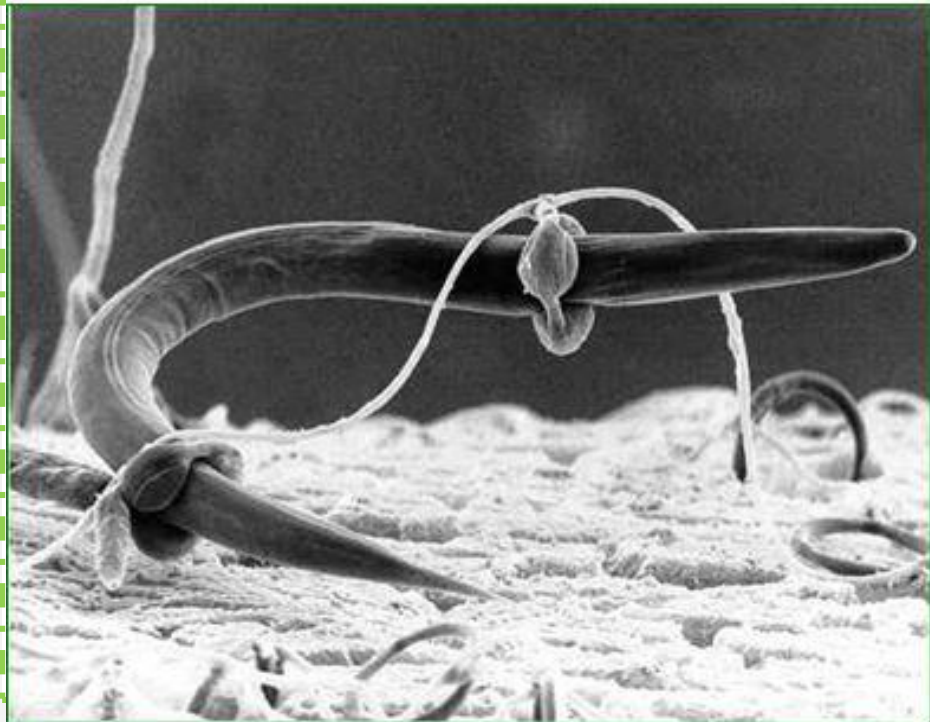
Origen

Composición

Arthrobotrys musiformis

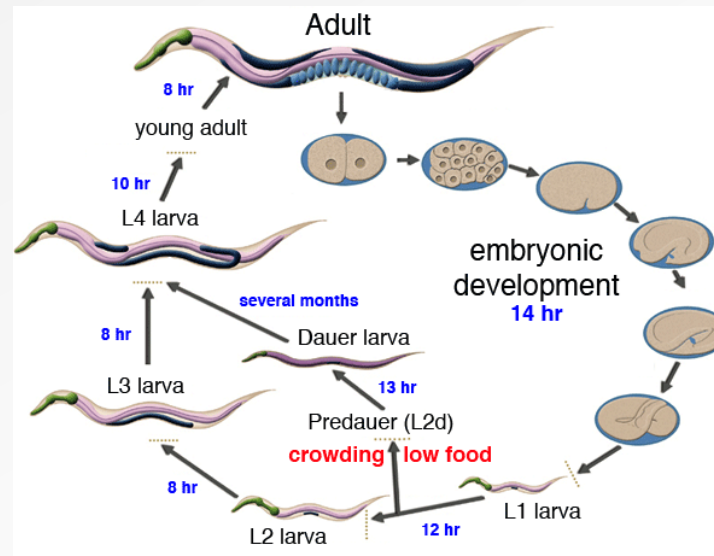


HONGOS NEMATÓFAGOS



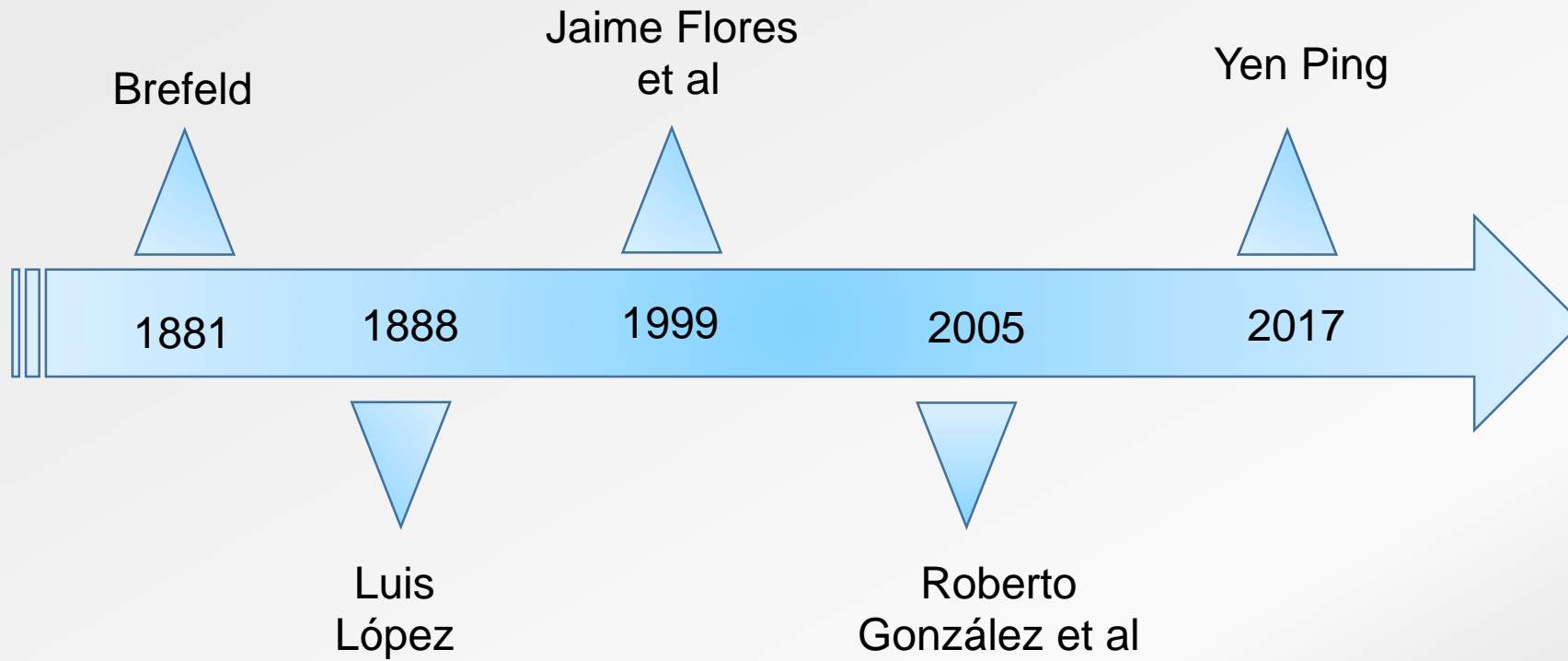
Nematodos

INTERACCIÓN HONGO NEMATÓDO



- Atracción / reconocimiento
- Adherencia
- Penetración
- Digestión

ANTECEDENTES



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de la acción nematófaga en hongos aislados del suelo, verificando su acción antagónica, utilizando como modelo experimental el nemátodo *Caenorhabditis elegans*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener un extracto de proteínas del modelo experimental *Caenorhabditis elegans* para incorporar al medio de cultivo como estímulo al desarrollo de hongos nematófagos.

Desarrollar el medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento del hongo nematófago

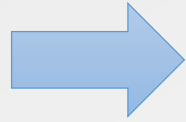
Verificar la acción antagónica de los hongos nematófagos en el medio de cultivo desarrollado.

DISEÑO METODOLÓGICO

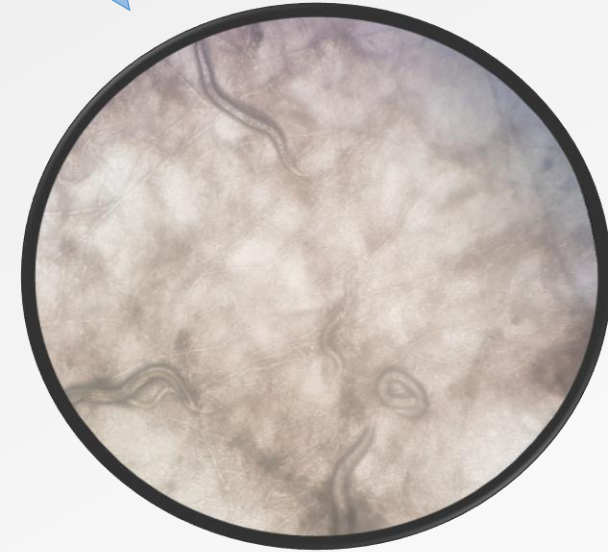
Fase 1: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS



Preparación medio NGM



Siembra de nemátodos Plug agar



Lavado de 3 placas con solución M9

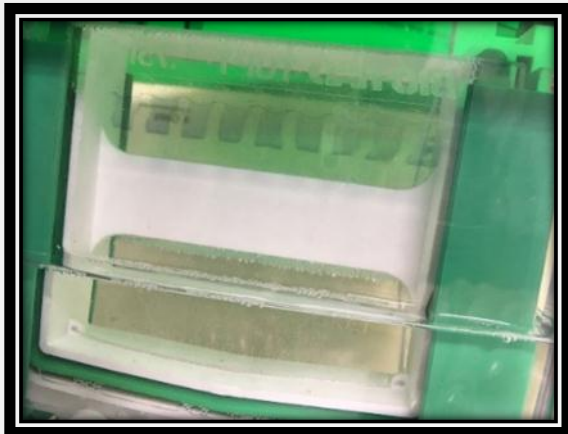


Sobrenadante de nemátodos



<https://wholesaler.alibaba.com/w/whole-sale-transducer-ultrasonic-cleaner.html>

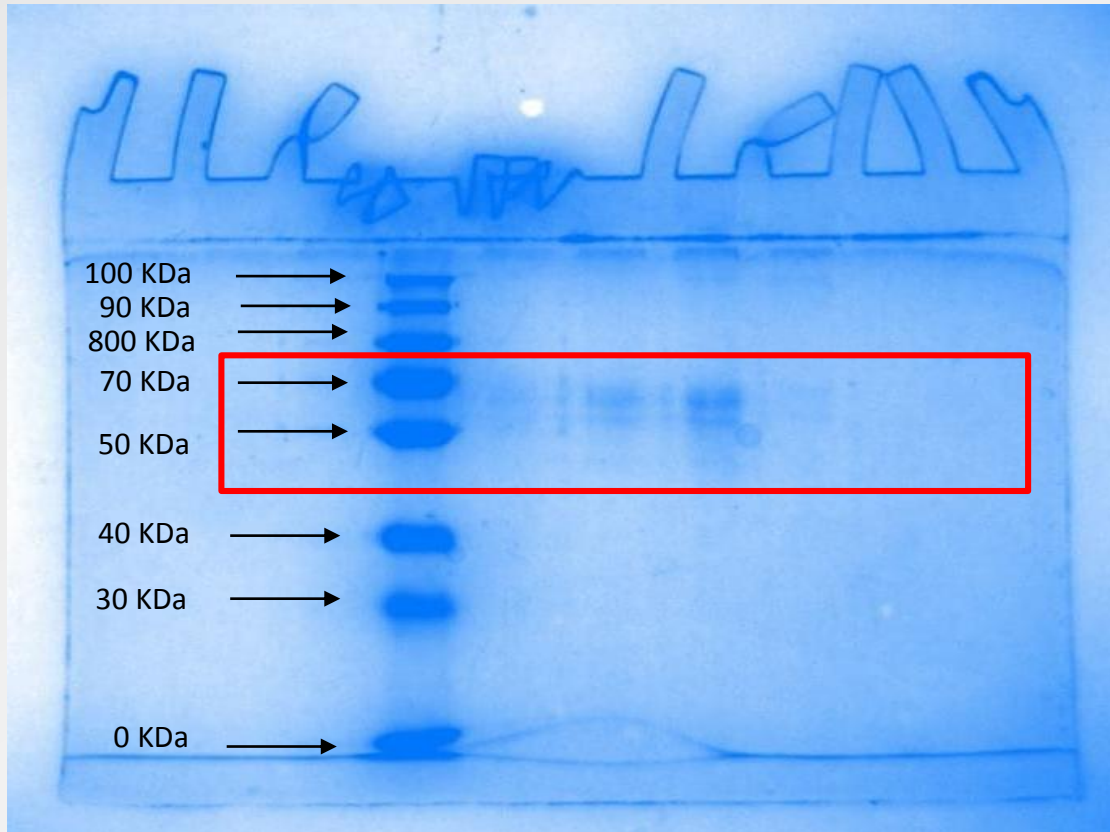
Ultrasonicación



Electroforesis SDS-PAGE

Resultados y discusión

Fase I: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS



Corrido electroforesis SDS-PAGE

Bhaskara Shilesh
2011

Verificó la integridad de las proteínas y determino que casi toda la proteína permanecía intacta después de la sonicación

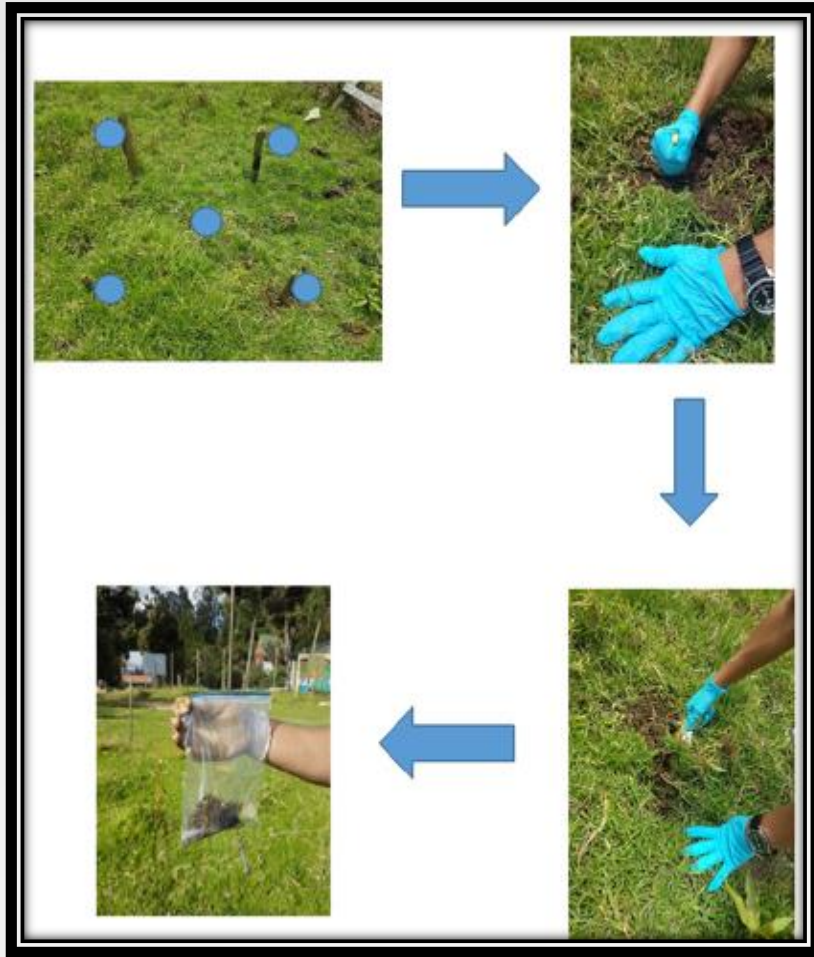
James Kramer
1988

Caracterizo una molécula de colágeno presente en la membrana de *C. elegans* identificando un peso molecular de 52 kDa

George Cox
2014

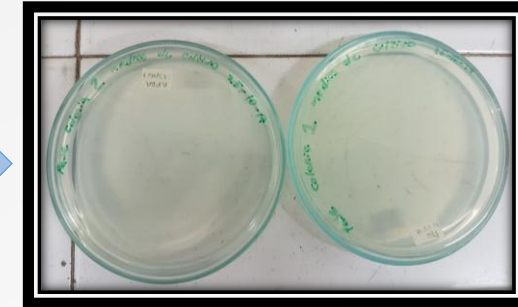
Afirma que porciones del colágeno de la membrana de *C. elegans*, poseen un peso molecular menor a 1000 kDa

Fase 2: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO NEMATÓFAGO.

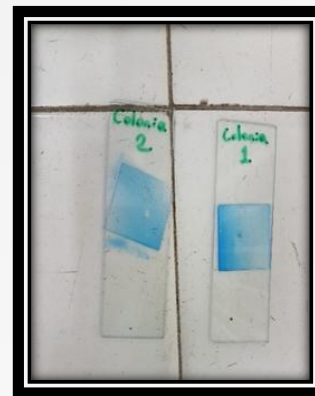


TOMA DE MUESTRA: muestreo sistemático en X. Tomado de protocolo de toma de muestras de suelos.¹

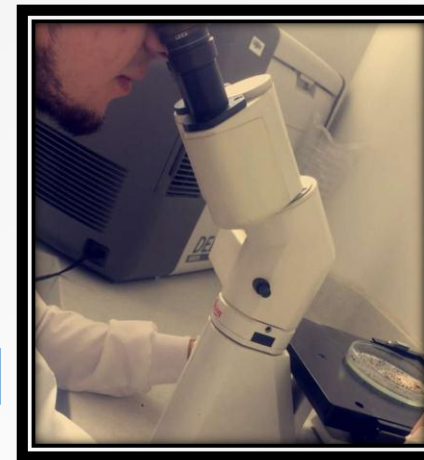
Lugar	Muestras
Fosca (Cundinamarca)	2 muestras de suelo en una finca a las afueras de la cabecera municipal
La Calera (Cundinamarca)	5 muestras : -Materia fecal de perro -Materia fecal seca de vaca -Materia fecal fresca de vaca -Materia fecal fresca de caballo -Compost de materia fecal de caballo



Preparación agar agua y agar Sabouraud



Tinción con azul de lactofenol



Siembra de nematodos por plug y seguimiento durante 15 días

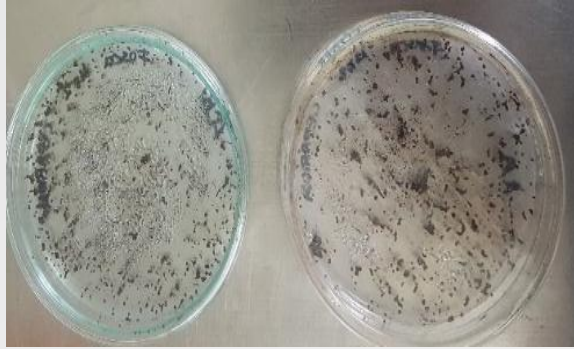


Siembra por espolvoreo (Barrón en 1977)

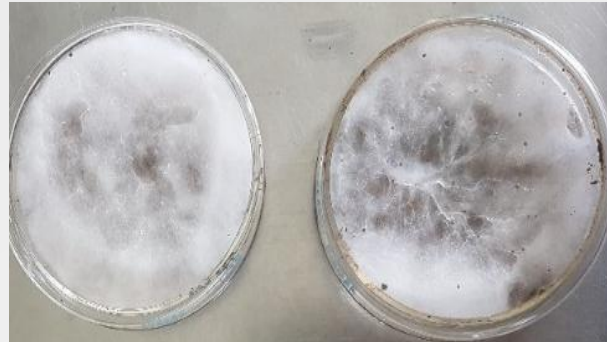
Resultados y discusión

Fase 2: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO NEMATÓFAGO.

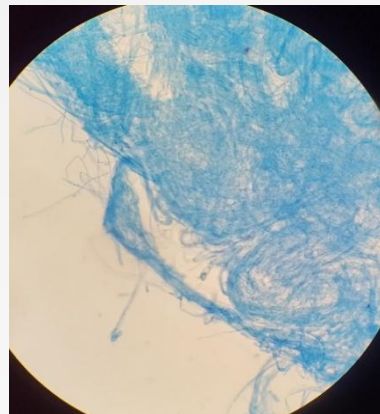
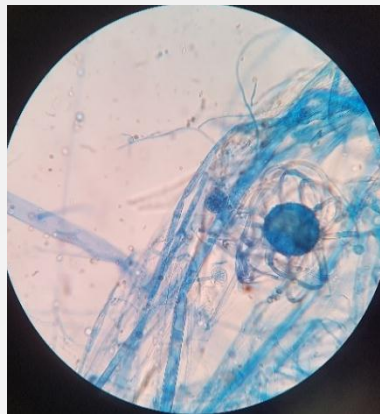
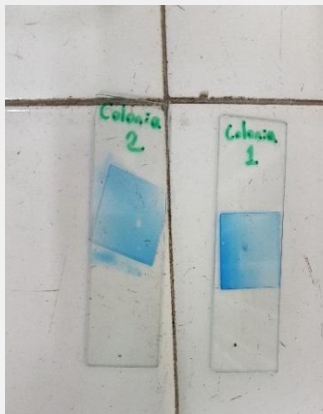
Crecimiento muestras Fosca



Muestra sembrada en agar agua.



Crecimiento de hongo en agar Saboraud



Identificación morfológica con azul de lactofenol mediante clave dicotómica

1	Hifa ausente. Colonias pequeñas, redondas y brillantes, de color blanco a crema	Ir a 2
	Hifa presente, colonia algodonosa, puede ser colorada	Ir a 3
2	Colonia con pequeñas células, 0,5 a 2 um de diámetro, células individuales que no pueden ser diferenciadas al microscopio	Bacteria
	Colonias con células de 3-10um de diámetro, células individuales redondas u ovaladas que pueden ser identificadas bajo microscopio	Levadura
3	Células pequeñas (Esporas) pueden ser vistas encima o relacionadas con hifas. Esporas producidas en sacos o estructuras redondas	4
	No se observan esporas, únicamente se ve micelio	Hongo estéril

Clave dicotómica

Resultados y discusión

Fase 2: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO NEMATÓFAGO.

Muestras de La Calera

Nº	Muestra	Resultado
1		Suelo con materia fecal seca de perro
2		Suelo con materia fecal seca de vaca

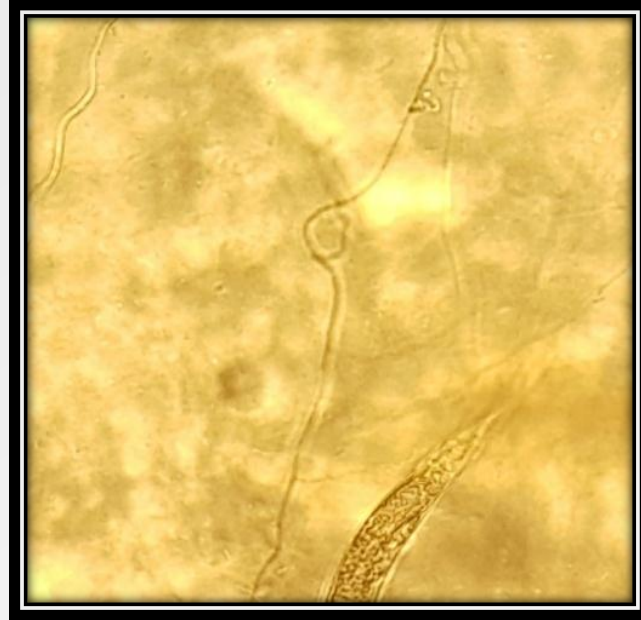
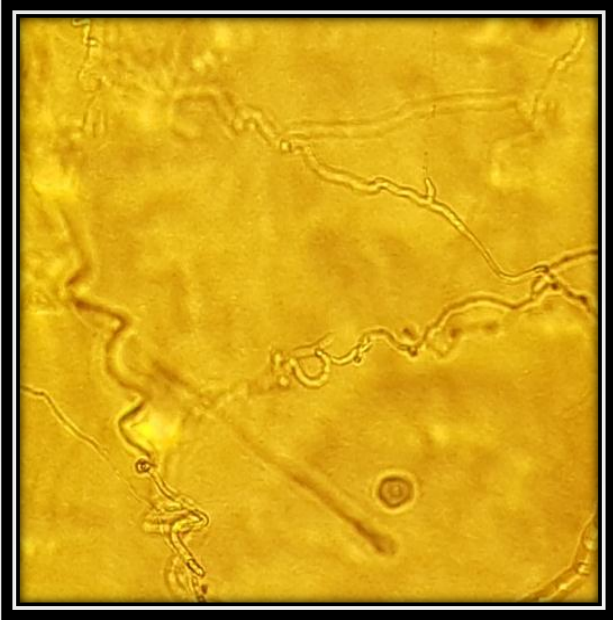
Luis López
1988

En los primeros 30 cm de suelos agrícolas y forestales se encuentran organismos ubicuos como los hongos nematófagos y nemátodos

Jaffee
1998

El desarrollo de hongos con capacidad nematófaga es mayor en la parcela orgánica que en la parcela convencional

Resultados y discusión



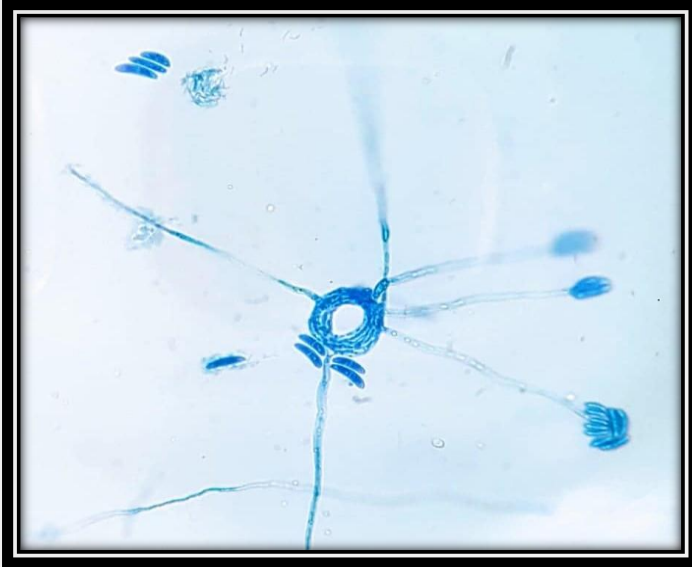
A los 15 días de incubación de las muestras 2 y 3

Se evidencia que los nemátodos atrapados se encuentran con pérdida de movilidad y sin capacidad de forcejear ante la constricción que realizan las hifas.

Márquez 2011

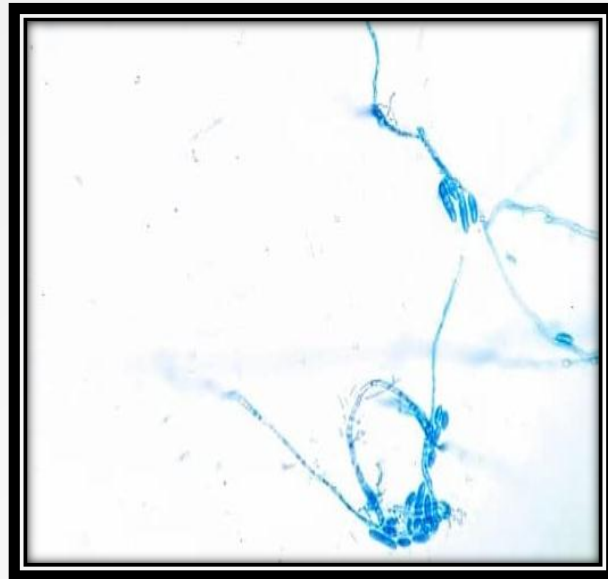
Describe el estímulo que le proporcionan los nemátodos a los hongos, ayudando a su crecimiento cuando se encuentra en un estado de estrés generado por el agar agua.

Resultados y discusión



Carlos
Saumell
2000

Arthrobotrys musiformis, tiene un alto potencial como agente de control biológico, por su capacidad de soportar el estrés que le genera el tracto gastrointestinal de los rumiantes y aun así lograr mantener sus cualidades nematófagas



Ha sido descrito formando redes adhesivas tridimensionales y anillos simples en presencia de nemátodos, con la capacidad de desarrollar estructuras de reproducción en cantidades considerables

Morfología hongo nematófago, compatible con *Arthrobotrys musiformis* en tinción de azul de lactofenol

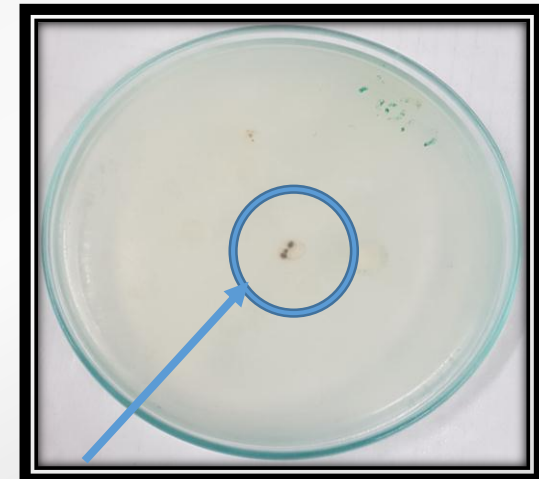
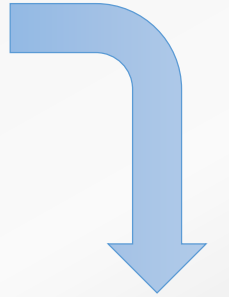
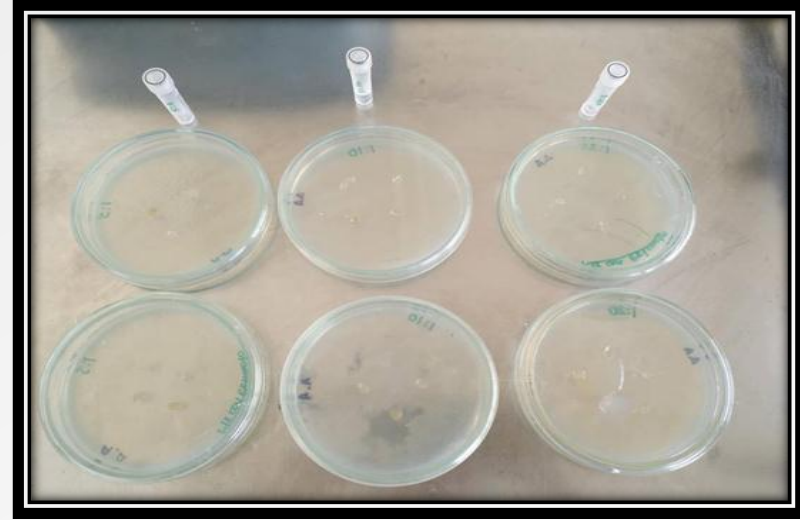
Fase 3: VERIFICACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL MEDIO DE CULTIVO DESARROLLADO



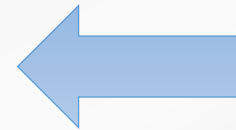
Preparación agar agua



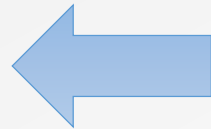
Preparación de las dilución inicial 1:5 y diluciones seriadas 1:10; 1:20



Siembra del hongo *Arthrobotrys musiformis* mediante la técnica plug agar



Elaboración del control negativo

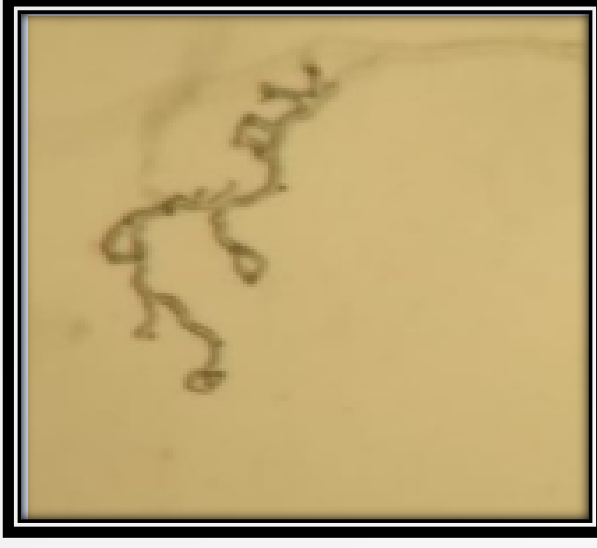


Seguimiento microscópico 24 y 48 h



Dilución 1:5

Crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado con formación de 2 a 3 anillos constrictores por campo.



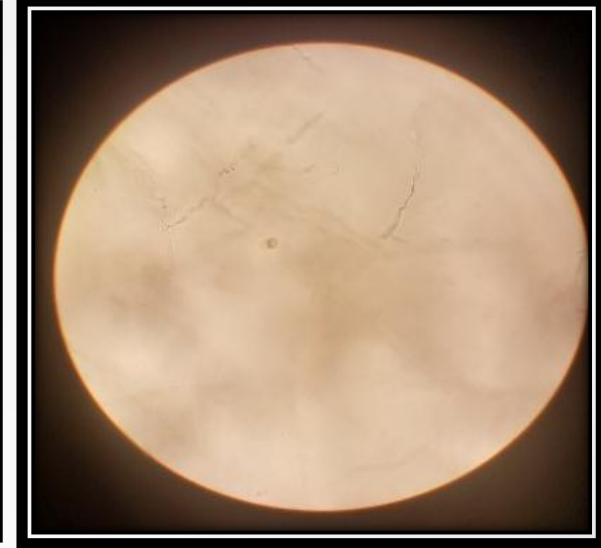
Dilución 1:10

Crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado con formación de 1 a 2 anillos constrictores por campo.



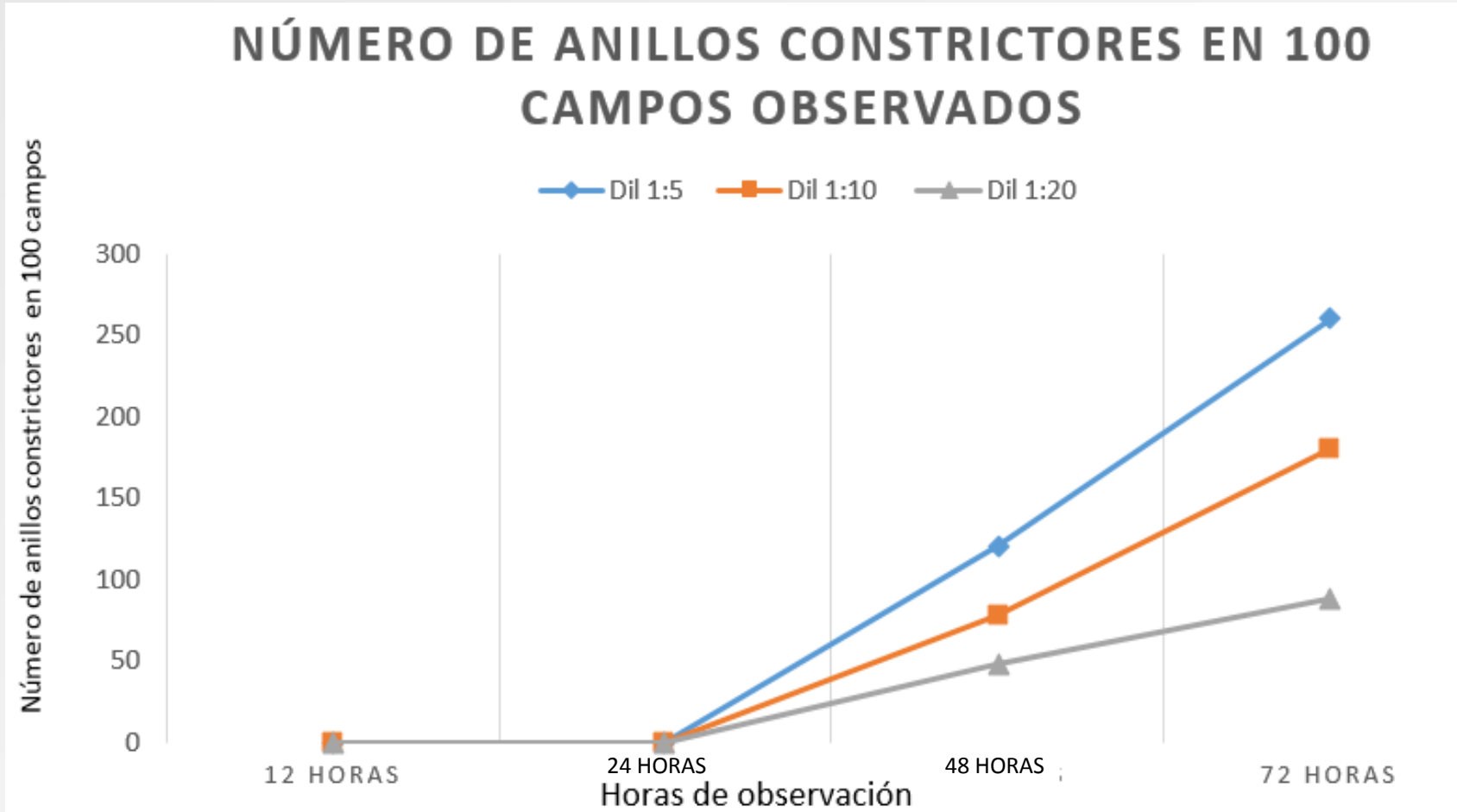
Dilución 1:20

Crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado con formación de 0 a 1 anillo constrictor por campo.



Control negativo

Resultados y discusión



GRAFICA 1. Número de anillos constrictores observado en 100 campos, en objetivo 40x a las 12h, 24h y 48h y 72h después de la siembra en el agar con las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 del extracto de proteínas del modelo animal *C. elegans*. (Autores)

Conclusiones

Con la realización del trabajo se obtuvo un extracto de proteínas del modelo experimentales del nematodo *C. elegans*, el cual se incorporo al medio como estímulo del hongo nematófago y de esta manera mejoro el mantenimiento y la viabilidad del mismo.

Se logro desarrollar el medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento del hongo, usando como medio base el agar agua, generando estrés al hongo para que se diera la activación de la acción nematófaga en busca de la fuente nutricional.

Se verifico en el medio de cultivo desarrollado que al tener disponible las proteínas libres en el mismo, se potencializa la acción antagónica de los hongos con el nematodo a un menor tiempo.

Referencia bibliográficas

1. Protocolo de toma de muestras de suelos, gobierno de Chile, Santiago de Chile, 2013, [Internet], Disponible en pdf:

<https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/Protocolo%20toma%20muestras%20suelo.pdf>

2. Ping Hsueh Yen , Gronquist Matthew R, Schwarz Erich M, David Nath Ravi, Han Lee Ching, Gharib Shalha, Schroeder Frank C, W Sternberg Paul, Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. 2017. *elife*. 6: 12-15; . [Citado 8 Agosto 2018] Disponible en:

<https://elifesciences.org/articles/20023>

3. Barron GL. The nematode destroying fungi .Topics in Mycobiology No.1 Canadian Biological publications . 1977. P140. [Citado 15 Abril 2018] Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945024013.pdf>

AGRADECIMIENTOS

Grupo de investigación Ceparium
Docente Ligia Consuelo Sánchez



Grupo de investigación de Biotecnología y Genética
Docente Ruth Sanchez

Bacteriologa y lab. Clinco Lizeth Gonzalez



Universidad de
La Sabana