

**Pasantía en el Laboratorio de Microbiología Aplicada
Universidad CES**

Estudiante
Juan Camilo Garrido

Directora
Paola Andrea Zapata

Trabajo de Grado
En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Ecología
Universidad CES
Medellín
Abril 2023

Pasantía en el Laboratorio de Microbiología Aplicada

Universidad CES

Juan Camilo Garrido

Resumen

Colombia es un país megadiverso con una gran riqueza fúngica por descubrir y en los últimos años el interés sobre este reino en particular ha aumentado no solo a nivel nacional sino también a nivel mundial; esto se evidencia en nuevos registros en las colecciones biológicas, nuevos desarrollos a partir de sus metabolitos y aumento en el número de grupos de investigación y publicaciones con este objeto de estudio. Tradicionalmente las colecciones biológicas de hongos son deshidratadas y almacenadas en anaqueles, sin tener en cuenta el poder generar colecciones biológicas de cepas de importancia en diferentes áreas. Por lo anterior, existe una necesidad creciente de generar nuevas colecciones biológicas de cepas vivas conservadas, que reflejen la diversidad de nuestra funga y a la vez que cubran la demanda actual de las investigaciones, y para su aplicación en el sector industrial, farmacéutico, cosmético, alimentario y sector agro, así como también que estén disponibles para la docencia. El Laboratorio de Microbiología Aplicada es un nuevo espacio de la Facultad de Ciencias y Biotecnología de la Universidad CES, dedicado a la biotecnología con microorganismos. Mi pasantía en el Laboratorio de Microbiología Aplicada fue una excelente oportunidad de trabajo multidisciplinario, necesario para afrontar nuevos retos en un planeta cambiante. El objetivo consistió en desarrollar habilidades en los procesos biotecnológicos relacionados con el cultivo y conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico. Entre los resultados obtenidos se destaca la creación de un cepario de hongos filamentosos con potencial biotecnológico.

Palabras clave: Cultivo, biotecnología, conservación, hongos, colección.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	1
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN	1
3. OBJETIVOS.....	2
3.1 OBJETIVO GENERAL	2
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
4. LOGROS ALCANZADOS.....	2
5. DIFICULTADES	4
6. RESULTADOS	4
6.1 MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN	4
6.2 PRODUCCIÓN DE SEMILLA	6
6.3 DIVULGACIÓN	8
7. CONCLUSIONES	9
8. RECOMENDACIONES	9
9. BIBLIOGRAFÍA.....	9

TABLA DE CONTENIDO

TABLA 1.. BANCO DE CEPAS, NUMBRE CIENTÍFICO Y COMÚN, FUENTE Y MATERIAL DE AISLAMIENTO	¡Error! Marcador no definido.
FIGURA 1 . A- CEPAS CONSERVADAS EN AGUA. B- CEPAS EN CULTIVO SÓLIDO, LÍQUIDO Y SEMILLAS DE HONGOS. C- CEPAS EN MEDIO SÓLIDO.	6
FIGURA 2. A-SEMILLA DE TRIGO REHIDRATADA EXTENDIDA LISTA PARA EMPACAR. B-BOLSAS CON GRANO ESTÉRIL LISTAS PARA INOCULAR. C- SEMILLA INOCULADA EN INCUBACIÓN.	7
FIGURA 3. FOTOS EN LAS DIFERENTES ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA EN DIFERENTES ESCENARIOS.....	8

1. Presentación

Los hongos son organismos de gran importancia ecosistémica, desarrollando diferentes papeles importantes, no solo como micorrízicos y/o patógenos si no también como descomponedores, este último es esencial en el establecimiento de las especies vegetales, siendo un elemento crucial en el ciclo y transporte de nutrientes (Mata 2003). Adicional a esto muchas especies son biocontroladores y las podemos encontrar en estrechas relaciones simbióticas con otras especies (Cepero et al., 2012). Los hongos son también de gran importancia económica, algunos con un impacto positivo en las actividades humanas como lo son los fermentados, panadería, medicamentos y aplicaciones biotecnológicas, otros con un impacto negativo como lo son las enfermedades y los patógenos en cultivos (Lodge et al., 2004).

Colombia es considerado como uno de los países de Suramérica mas biodiverso en cuanto a hongos, sin embargo, se considera que su estudio e investigación en este grupo de organismo ha sido subestimado (Gaya et al., 2021), principalmente en cuanto la obtención y mantenimiento de cepas silvestres que puedan ser utilizadas en diferentes áreas y hasta la fecha son muy pocos los trabajos sobre aislamiento de cepas de hongos silvestres y su domesticación (Ortiz-Moreno et al., 2022). Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de investigar sobre diferentes métodos del cultivo y conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico

La pasantía fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Aplicada (LabMiA), un nuevo espacio de docencia, investigación e innovación en la Universidad CES. Los procesos biológicos que se llevan a cabo en la unidad son en el área de la ciencia aplicada. En la unidad se hace uso tanto de tecnologías emergentes como de tecnologías tradicionales para la solución de problemas de la sociedad, así como el acompañamiento y desarrollo de ingredientes, métodos para la industria y productores locales. La unidad es un espacio interdisciplinario y actualmente se trabaja con microalgas y hongos.

El enfoque de la pasantía fue primordialmente en el campo de los hongos filamentosos con potencial biotecnológico, donde se utilizó diferentes métodos para el cultivo y la conservación para su preservación y futuro uso.

2. Reseña de la institución

La Universidad CES es una Universidad ubicada en la ciudad de Medellín, Colombia. Fundada el 5 de julio de 1977, es una fundación privada de educación superior, que ofrece carreras de pregrado y posgrado en múltiples áreas del conocimiento; desarrolla actividades de docencia, investigación, innovación, empresarismo y extensión. La calidad está representada en la acreditación y reacreditación por parte del Ministerio de Educación Nacional y del cual recibió un reconocimiento como institución educativa de alta calidad y

en 2014 fue acreditada por primera vez según Resolución No. 2675 del 28 de febrero, y recibió la renovación de la acreditación institucional en alta calidad a través de la Resolución 013602 del 9 de diciembre de 2019.

El Laboratorio de microbiología aplicada se encuentra ubicado en los exteriores del Bloque A. Tiene capacidad para 20 estudiantes y apoya la formación en investigación en las áreas de microbiología aplicada y Biotecnología. Por la dotación que tiene este espacio, se pueden desarrollar diferentes proyectos de investigación experimental. En él los estudiantes pueden ejecutar trabajos investigativos relacionados con el cultivo de microorganismos, procesos de fermentación, obtención de biomasa y sus metabolitos activos, ensayos de actividad biológica, entre otros relacionados. Tiene una infraestructura, encaminada al cultivo sumergido y convencional de hongos, cultivo de microalgas, disrupción celular y a obtener ingredientes bioactivos que puedan ser incorporados a diferentes matrices alimentarias, cosméticas, fitoterapéuticas o para el sector agro.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar habilidades en los procesos biotecnológicos relacionados con el cultivo y conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico en el laboratorio de microbiología aplicada en la Universidad CES.

3.2 Objetivos específicos

- Implementar técnicas de métodos de conservación y mantenimiento de hongos filamentosos tanto en cultivo líquido como en sólido, que permitan el establecimiento del cepario en LabMiA.
- Generar una capacidad instalada, técnica y metodológica para la producción de semilla de hongos comestibles en LabMiA.
- Participar de los procesos de divulgación del laboratorio tanto con comunidad interna como externa.

4. Logros alcanzados

Se lograron desarrollar diferentes habilidades en procesos de laboratorio y divulgación de la ciencia, como son:

- Búsqueda de información especializada:

La información acerca de cultivo de hongos para el establecimiento de ceparios, es un tema que aun está en desarrollo. Sin embargo, utilizando palabras clave seleccionadas, en los diferentes buscadores, se analizaba la información obtenida y se procedía a utilizar y almacenar en el gestor de referencias Mendeley. Las palabras claves utilizadas fueron: “Spawn”, “Micelium”, “Culture Medium”, “Liquid Culture”, “Agar médium”, “Consevation”, “Mushrooms Strain”. Adicionalmente, se consultaron autores reconocidos en esta temática como es Paul Staments y sus libros de cultivo de hongos y mantenimiento de cepas. Los artículos consultados fueron obtenidos haciendo uso de Google Scholar.

- Elaboración de medios de cultivo, sólidos y líquidos para el cultivo y conservación de cepas.

Se logro implementar cultivos sólidos y líquidos tanto para conservación como mantenimiento de las cepas. Los medios desarrollados contenían diferentes fuentes complejas como lo son: harina de cebada, salvado de trigo, malta, levadura nutricional, peptona. Adicionalmente se estableció un cepario de conservación en agua estéril, del cual se obtenían cepas de trabajo.

- Aislamiento de cepas a partir de cuerpos fructíferos. Para algunos hongos de interés, los cuerpos fructíferos eran procesados en el laboratorio para obtener micelio axénico. Debido al trabajo continuo en el laboratorio en cámara de flujo laminar con instrumental estéril, se logró obtener mayor cantidad de éxitos en los aislamientos.
- Mantenimiento de cepas de hongos filamentosos con potencial biotecnológico: Se logró el establecimiento del cepario con 16 cepas (Tabla 1), las cuales se encontraban disponibles en todo momento para docencia, semilleros y producción de semilla. Es de resaltar que, hasta antes de la ejecución de esta pasantía, LabMiA no contaba con un cepario establecido y que pudiera ofrecer diferentes cepas y semillas constantemente para el desarrollo de actividades ya sea a nivel de investigación, producción o docencia.
- Programación y desarrollo de actividades de divulgación tanto como para la comunidad universitaria como para la comunidad externa. Se realizaron tres tipos de divulgación:
 - Honguistas: Compartir con la comunidad académica diferentes platos donde el ingrediente principal fueron los hongos. Este fue un espacio para estudiantes profesores, personal administrativo e invitados, donde el objetivo era dar a conocer las actividades del laboratorio, adicional a esto, que las personas asistentes tuvieran la oportunidad de familiarizarse con el sabor de los hongos en preparaciones conocidas y de esta forma puedan ser incluidas en su dieta.

- Recorridos guiados: Se realizaron recorridos con aspirantes a la Universidad CES, visitantes y semilleros vocacionales. En estos recorridos se hablaba de las actividades e investigaciones que se realizaban en LabMiA. También se realizaban recorrido para el reconocimiento de la funga en las zonas aledañas al laboratorio.
 - Talleres de sensibilización sobre el reino de los hongos, su biología, cultivo y aplicaciones. Los talleres consistían en una charla, observación de material fresco y seco, práctica de cultivo y actividades lúdicas.
- Generación de nuevos contactos para que la unidad comenzara a comercializar sus productos o vender servicios. Debido al cepario establecido se logró comercializar semilla a productores locales y restaurantes.

5. Dificultades

La principal dificultad que se encontró en el desarrollo de la pasantía fue el estado del laboratorio ya que se encontraba aun en construcción y la obra no se había entregado a cabalidad, lo que se convirtió en un aspecto crítico para este proceso. Como fue el cuarto de siembra y el mantenimiento de las cepas, compartían espacio con otros procesos del laboratorio, lo cual ocasionó la contaminación de varios cultivos. Otra dificultad fue que el laboratorio en su parte instrumental no es aún robusto, por lo tanto, existían factores limitantes, como el volumen de la auto clave y la duración de sus ciclos, que dificultaba la ejecución de algunas actividades planeadas. Por otra parte, algunos insumos y reactivos que se requerían para los procesos se demoraban en llegar, debido a agentes externos. Entre las razones principales de la demora fueron, la escases de contenedores y la subida del dólar. Esto ocasionó que algunos proveedores ya no querían vender debido a que el precio por el cual se había cotizado, una vez aprobada la compra, ya había variado.

6. Resultados

6.1 Mantenimiento y Conservación

Se realizó la conservación de cepas de interés para el laboratorio o para productores.

El cultivo y mantenimiento de cepas de trabajo, se realizó en platos Petri con medios de cultivos estándares, como son agar malta y PDA, enriquecidos con salvado de trigo y harina de cebada.

La conservación de todas las cepas se realizó en agua estéril. Para esto se partió de un plato de Petri con medio de cultivo, donde el hongo de interés ya había colonizado en su totalidad, se cortaron cuadrados de 0.5 cm² de este agar colonizado, los cuales se depositaron (10 aproximadamente), en tubos de ensayo de tapa rosca, que contenían agua

desionizada estéril. Se eligió el método de conservación en agua estéril debido a su bajo costo y su alta efectividad (Panizo et al., 2005)

Tabla 1. listado de las cepas conservadas

Banco de Cepas				
Numero	Nombre científico	Nombre común	Fuente	Material de aislamiento
1	<i>Cyclocybe aegerita</i>	Pioppino	Proyecto Umay	Micelio (Comercial)
2	<i>Pholiota adiposa</i>	Seta de la nuez	Proyecto Umay	Micelio (Comercial)
3	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Wine cap	Proyecto Umay	Micelio (Comercial)
4	<i>Lentinus tigrinus</i>	Tiger saw	Proyecto Umay	Micelio (Comercial)
5	<i>Hericium erinaceus</i> (Variedad US)	Melena de león	Proyecto Umay	Micelio (Comercial)
6	<i>Hericium erinaceus</i>	Melena de león	Proyecto Umay	Cuerpo fructífero
7	<i>Lentinus edones</i>	Shiitake	Proyecto Umay	Cuerpo fructífero
8	<i>Pleurotus eryngii</i>	Seta de cardo	Proyecto Umay	Cuerpo fructífero
9	<i>Flammulina velutipes</i>	Enoki	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
10	<i>Pleurotus columbinus</i>	Orellana azul	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
11	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Orellana amarilla	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
13	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Orellana Café	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
14	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Orellana blanca	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
15	<i>Pleurotus djamor</i>	Orellana rosada	BioVeg UdeA	Semilla (Comercial)
16	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderma	Recolectada	Cuerpo fructífero
15	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Oreja de Judas	Recolectada	Cuerpo fructífero
16	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Pollo del bosque	Recolectada	Cuerpo fructífero



Figura 1. A- Cepas conservadas en agua. B- Cepas en cultivo sólido, líquido y semillas de hongos. C- Cepas en medio sólido.

6.2 Producción de semilla

El uso de la semilla de hongos como medio de cultivo ha sido utilizado por décadas y es considerado el estándar actual en la industria del cultivo de hongos comestibles, esto es debido a su eficacia y facilidad de uso. El proceso de elaboración de la semilla para el cultivo de hongos filamentosos se realizó de acuerdo con la metodología propuesta y estandarizada por Stamets & Chilton en el libro "Mushroom Cultivator" (1983). Los pasos principales en la elaboración de semilla para el cultivo de hongos comestibles consisten en:



Figura 2. A-Semilla de trigo rehidratada extendida lista para empacar. B-Bolsas con grano estéril listas para inocular. C-Semilla inoculada en incubación.

1. Selección de la cepa: Se seleccionó una cepa de hongo de alta calidad, con buena capacidad de crecimiento y producción de cuerpos fructíferos.
2. Preparación del medio de cultivo: Se preparó un medio de cultivo adecuado para el hongo seleccionado. Este medio podía variar dependiendo del tipo de hongo y podía contener nutrientes como glucosa, extracto de levadura, sales y otros componentes necesarios para el crecimiento del hongo.
3. Inoculación del medio de cultivo: Se inoculó el medio de cultivo con esporas o micelio de la cepa seleccionada. El medio de cultivo se esterilizaba para eliminar cualquier microorganismo no deseado y luego se inoculaba con una pequeña cantidad de micelio.
4. Incubación: Los medios de cultivo inoculados fueron puestos en un ambiente adecuado para la incubación, es recomendable incluir temperatura y humedad controladas. Durante la incubación, el micelio del hongo se propagó y creció en el medio de cultivo.
5. Mantenimiento de cepas de trabajo: Una vez que el micelio había crecido lo suficiente, se transfería a otro medio de cultivo de forma seriada para aumentar su concentración.
6. Producción de semilla: se implementó como inóculo la mitad del micelio de cultivo axénico de un plato de Petri por kilogramo de semilla estéril, esto debido a que una

buena cantidad de micelio de partida aceleraba el tiempo de colonización y por lo tanto bajaba la incidencia de contaminación.

7. Incubación de la semilla: Las bolsas de granos fueron incubadas en oscuridad por 20 a 30 días, hasta que estuvieran completamente colonizados por el hongo. El tiempo requerido para la colonización completa de la semilla depende de la relación inóculo sustrato.

6.3 Divulgación

Se participó en diferentes actividades del laboratorio relacionadas con la investigación, innovación y la docencia, entre las cuales se destacan:

- Preparaciones de recetas con hongos para la comunidad CES.
- Participación en los semilleros vocacionales de la facultad.
- Participación en el semillero de biotecnología de hongos comestibles y medicinales.
- Recorridos a aspirantes CES.
- Capacitación en el cultivo a chefs y staff del grupo gastronómico Carmen.



Figura 3. Fotos en las diferentes actividades de divulgación científica en diferentes escenarios.

7. Conclusiones

- Se fortaleció el Laboratorio de Microbiología Aplicada a través de la creación de una colección biológica con 16 especies de hongos de interés biotecnológico, lo que permite tener disponibilidad de material biológico de fácil acceso para la docencia, investigación, innovación y potencial comercialización.
- Se amplió la visibilidad del Laboratorio mediante las actividades de divulgación.
- Se generaron contactos de alto valor para el laboratorio, tanto para llevar a cabo procesos de docencia continua, investigación, extensión y divulgación.
- La participación de ecólogos en pasantías en áreas de ciencia aplicada es una excelente oportunidad de trabajo multidisciplinario, necesario para afrontar nuevos retos en un planeta cambiante.

8. Recomendaciones

- Desarrollar e implementar un sistema de calidad para el mantenimiento de la colección de hongos.
- Gestionar ante los entes regulatorios la Colección Biológica, con el objetivo de tener un banco de cepas al servicio de la Universidad y de la comunidad.
- Mejorar las condiciones del laboratorio en lo relacionado a la producción de semilla y manejo de las cepas, que reduzca la incidencia de contaminaciones.

9. Bibliografía

Cepero, M., Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de los hongos*. Universidad de los Andes. 520pp.

Gaya, E., Vasco-Palacios, A. M., Vargas-Estupiñán, N., Lücking, R., Carretero, J., Sanjuan, T., Moncada, B., Allkin, B., Bolaños-Rojas, A. C., Castellanos-Castro, C., Coca, L.F., Corrales, A., Cossu, T., Davis, L., dSouza, J., Dufat, A., Franco-Molano, A. E., García, F., Gómez-Montoya, N., González-Cuellar, F.E., Hammond, D., Herrera, A., Jaramillo-Ciro, M.M., Lasso-Benavides, C., Mira, M.P., Morley, J., Motato-Vásquez, V., Niño-Fernández, Y., Ortiz-Moreno, M. L., Peña-Cañón, E. R., Ramírez-Castrillón, M., Rojas, T., Ruff, J., Simijaca, D., Sipman, H. J. M., Soto-Medina, E., Torres, G., Torres-Andrade, P. A., Ulian, T., White, K., Diazgranados, M. (2021)

ColFungi: Colombian resources for Fungi Made Accessible. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. 36p.

Lodge, D. J., Ammirati, J. F., O'dell, T. E., Mueller, G. M., Huhndorf, S. M., Wang, C. J., Stokland, J. N., Schmit, J. P., Ryvarden, L., Leacock, P. R., Mata, M., Umaña, L., Wu, Q. F., & Czederpiltz, D. L. (2004). Terrestrial and Lignicolous Macrofungi. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, 127–172. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50011-8>

Mata, M. (2003). *Macrohongos de Costa Rica = Costa Rica Mushrooms* (2.ª ed.). Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. 256 pp.

Ortiz-Moreno, M. L., De Almeida, R. F., Cárdenas, M., Guevara-Suarez, M., Marbello, A., Bolaños, N., Jiménez, P., & Restrepo, S. (2022). Chapter 13 Biotechnology of Fungi of Colombia. In: Almeida, R., Lücking, R., Vasco-Palacios, A., Gaya, E. & Diazgranados, M. *Catalogue of Fungi of Colombia* (pp 164-173). Royal Botanic Gardens Kew and The Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Panizo, M. M., Reviákina, V., Montes, W., & González, G. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 35–40. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es7

Stamets, P., & Chilton, J. S. (1983). *The mushroom cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*. Agarikon Press. 415 PP.