

Proyecto: “Adaptación e implementación de cinco cepas de hongos comestibles en diferentes subproductos agrícolas para mejorar la productividad y competitividad de ASOFUNGICOL en el Huila”

MANTENIMIENTO DE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES



PROTOCOLOS

- Aislamiento de carpóforos
- Mantenimiento de cepario

Realizado por: Nelson Rodríguez Valencia
Investigador Científico I. Cenicafé.
Martha Liliana Araque Fonseca
Servicios Profesionales. Cenicafé.
Francenid Perdomo Perdomo.
Servicios Profesionales. Cenicafé.

PRESENTACIÓN

El proyecto empresarial de innovación y desarrollo tecnológico “Adaptación e implementación de 5 cepas de hongos comestibles en diferentes subproductos agrícolas para mejorar la productividad y competitividad de la Asociación de productores de hongos comestibles de Colombia ASOFUNGICOL”, tuvo como propósito encontrar las mejores formulaciones de sustrato, elaborados a partir de los subproductos agrícolas más abundantes en el departamento del Huila e identificar las cepas de hongos de mayor rendimiento, facilitadas por el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), de forma que se mejore el proceso de cultivo de setas de los asociados.

De igual manera busca transferir a la Asociación todos los conocimientos relacionados con el manejo del material biológico y la producción de semilla comercial, por ser éste uno de los mayores obstáculos que han tenido los cultivadores.

El proyecto se realizó con la financiación del SENA, la Gobernación del Huila y la CAM, bajo la dirección técnica de Cenicafé.

En su desarrollo se utilizaron los laboratorios del Centro Agropecuario la Angostura perteneciente al SENA, Regional Huila, para la obtención de la semilla de los hongos y para el manejo postcosecha del cultivo.

La fase de campo se realizó en los cultivos de los Asociados en los Municipios de Rivera, Garzón, Tesalia y Teruel, en el Departamento del Huila.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Metodologías básicas de laboratorio	4
Aislamiento de carpóforos	8
Mantenimiento de cepario	10
Problemas, causas y soluciones	14



METODOLOGÍAS BÁSICAS DE LABORATORIO

El diseño del laboratorio, el manejo de las técnicas y la destreza del personal para la producción de semilla comercial debe apuntar principalmente a evitar errores que ocasionen contaminación que deteriore la calidad de la semilla y con ello la productividad de los cultivos.



DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de producción de semilla comercial es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes. Se debe, por tanto, iniciar la limpieza del área de cultivo con el retiro de suciedades de mesones, pisos, paredes y ventanas para luego desinfectar las superficies con una solución de hipoclorito al 10% y trapear con hipoclorito al 2%. Los contaminantes más comunes en estas áreas son bacterias y esporas de hongos que habitan en el ambiente. Se recomienda realizar una rotación diaria con las siguientes soluciones desinfectantes: Timsen (1g timsen/500ml agua), Vanodine (2.5 ml vanodine/500ml agua), Cloruro de benzalconio (2.5g de cloruro de benzalconio/500ml agua), con el fin de evitar que se desarrolle resistencia de los microorganismos a los desinfectantes.

Para garantizar la pureza de los cultivos de los hongos comestibles y medicinales, la etapa de producción de semilla debe realizarse en una cámara de flujo laminar la cual se desinfecta con la solución de cloruro de benzalconio, horas antes de iniciar las siembras y durante el procedimiento de inoculación se utiliza alcohol al 70% para desinfectar constantemente la cabina y las manos del técnico.

Periódicamente y durante la siembra debe realizarse un control de ambiente por precipitación, para establecer el nivel de contaminación del laboratorio y la frecuencia de aplicación de los desinfectantes. Esta evaluación consiste en la exposición de una caja de petri que contiene un medio de cultivo, por 15 minutos al ambiente y que luego se incuba a una temperatura de 25°C durante 5 días, si se utiliza EMA para evaluar hongos y levaduras, y a una temperatura de 37°C por 24 horas cuando se utiliza como medio Agar plate count para evaluar bacterias.

LAVADO, SECADO Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE LABORATORIO

El material que se va a utilizar en la preparación de la semilla debe sumergirse de un día para otro en una solución jabonosa compuesta por 10 g de detergente en polvo y 20 ml de hipoclorito comercial, por cada litro de agua. Se lava con abundante agua asegurándose de no dejar restos de jabón que puedan afectar el crecimiento micelial. Seguidamente, se seca y esteriliza el material de vidrio y de acero inoxidable en la estufa por 3 horas a 160°C y se deja enfriar en un sitio previamente desinfectado.

Para la esterilización del material con vapor se utiliza una autoclave a 121°C durante 30 minutos. La autoclave debe lavarse cada día de por medio, por fuera y por dentro, cambiarse el agua (utilizar agua destilada) y engrasarse con vaselina cada dos esterilizaciones.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para la conservación y propagación de las cepas son: Papa Dextrosa Agar (PDA), el Agar Extracto de Malta (EMA) y el Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), que son especialmente elaborados para el crecimiento de hongos e inhiben la contaminación bacteriana gracias a su bajo pH.

Para garantizar la esterilidad en la preparación de los medios de cultivo se requiere agua destilada estéril (el agua debe esterilizarse en una autoclave a 121°C durante 20 min). Utilizar materiales previamente esterilizados en autoclave y los medios se sirven en la cabina de flujo laminar previamente desinfectada.

Los medios de cultivo se preparan de acuerdo con las recomendaciones dadas por el fabricante, registradas en la etiqueta del empaque. En una probeta se mide el agua destilada estéril necesaria, se transpasa a un erlenmeyer junto con la cantidad de medio necesario y se coloca en la estufa agitando constantemente con la ayuda de una varilla de vidrio hasta que el medio hierva. Luego se sirve en tubos, botellas planas o cajas de petri, junto a mecheros, de la siguiente manera:

- En la preparación de los tubos, se utilizan 5 ml del medio de cultivo para tubos de 15x100 mm, si se utilizan tubos de mayor dimensión se puede utilizar una relación lineal para el cálculo del volumen del medio que se debe adicionar. Los tubos se cierran suavemente y luego se esterilizan dentro de beakers y al terminar el proceso, se retiran de la autoclave, se ajustan las tapas y se disponen de forma inclinada hasta que se solidifiquen, con el fin de incrementar el área de contacto, en una zona previamente desinfectada.
- En la preparación de cajas de petri se coloca a esterilizar el medio de cultivo en un erlenmeyer con tapón de algodón y se sirve caliente bajo cámara de flujo laminar, adicionando 15 ml de agar por caja de petri, las cuales deben estar estériles y se colocan a enfriar en un área cerrada y previamente desinfectada. Si las cajas no se van a utilizar de inmediato, tan pronto el agar solidifique, se sellan con papel vinilpel y se refrigeran, por un tiempo máximo de 15 días.
- En la preparación de las botellas planas se utilizan 60 ml del medio de cultivo, se les coloca un tapón de algodón y se esterilizan, disponiéndolas en forma vertical y luego se enfrían horizontalmente. Es importante esterilizar tapones de algodón dentro de una bolsa de polipropileno termoresistente, en caso de tener que reemplazar algún tapón de las botellas que resulte impregnado de medio y que puede favorecer el asentamiento de microorganismos contaminantes.
- Se debe incubar una caja, tubo o botella con medio nutritivo estéril y sin sembrar para verificar la esterilidad del medio de cultivo, en lo que se conoce como “control medio”.

DISPOSICIÓN DEL MATERIAL DE DESECHO

Para evitar la contaminación cruzada o afecciones respiratorias en el personal del laboratorio, es necesario esterilizar el material contaminado antes de su eliminación. Para ello los tubos, las cajas o las botellas planas con el microorganismo contaminante deben esterilizarse en una autoclave durante 1 hora a 121°C.

SELECCIÓN



Carpóforos de *Pleurotus sajor caju*, cultivados en desechos agrícolas

La selección cuidadosa de los carpóforos, que posean las mejores cualidades fenotípicas (tamaño, color, forma, vigor), para la producción de semilla comercial, redundará en la calidad de la misma y la productividad de nuestros cultivos.

AISLAMIENTO DE CARPÓFOROS

Las setas se reproducen por medio de esporas, las cuales se alojan en las laminillas que se ubican debajo del píleo o sombrero, tejido que se utiliza para el aislamiento de la cepa.

Para cultivar los tejidos de los cuerpos fructíferos de la cepa que se quiera aislar es necesario realizar una selección cuidadosa de los individuos con mejores cualidades fenotípicas como: tamaño, aspecto, color, crecimiento, adaptación, precocidad, etc.



Carpóforos de *Pleurotus ostreatus*

Una vez escogidas las setas, se toma un trozo del sombrero y en una caja de petri vacía y estéril se hacen cortes del tejido externo del trozo seleccionado y se desechan. Luego, el tejido resultante se sumerge en una solución desinfectante (hipoclorito al 25%), durante 5 minutos, pasado el tiempo el tejido se sumerge en agua destilada estéril para eliminar el desinfectante y se traslada a una caja de petri que contenga servilletas estériles, con las cuales se le elimina el exceso de agua y nuevamente se le hacen cortes externos, dejando solamente la parte interna, la cual es transferida a una caja de petri con agar extracto de malta y se incuba a 25°C de 7 a 10 días.

La cepa así aislada puede mantenerse vigorosa hasta por año y medio, siempre y cuando se almacene a temperaturas de refrigeración y/o crioconservación, realizando repiques en agar cada tres meses.

PROTOCOLO

1. Preparar cajas de petri con agar extracto de malta, papa dextrosa agar y/o agar sabouraud, de acuerdo con la metodología básica de laboratorio.
2. Disponer de los siguientes materiales: cajas de petri vacías, cajas de petri con servilletas, pinzas, pipetas de 10 ml, beakers de 100 ml, bisturí, botellas con agua estéril.

3. Lavar y esterilizar el material de vidrio y el instrumental de acuerdo a las metodologías básicas de laboratorio.
4. Retirar de la nevera los medios para la siembra y desinfectar las cajas con alcohol. Para permitir que se aclimate antes de utilizarlo debe ser retirado aproximadamente 1 día antes.
5. Limpiar y desinfectar el laboratorio y la cabina de flujo laminar o área de siembra según las metodologías básicas de laboratorio. Encender mecheros
6. Mantener cerrada la puerta del laboratorio. Mantener una bata limpia, cofia y tapabocas al interior del laboratorio, y una a la salida para el cambio.
7. Seleccionar un carpóforo con excelentes características fenotípicas y seccionar un trozo para aislar la cepa, y con la ayuda del bisturí y de las pinzas eliminar los tejidos externos.
8. Desinfectar el trozo de carpóforo en hipoclorito al 25% durante 5 minutos, luego sumergir el trozo en agua destilada estéril durante 5 minutos más.
9. Eliminar el exceso de agua pasando el pedazo de tejido a una caja de petri con servilletas estériles.
10. El fragmento de carpóforo se siembra en una caja de petri con agar extracto de malta y se incuba a 25° C, de 7 a 10 días.
11. Recoger la basura y limpiar y desinfectar el área de trabajo, después de realizada la siembra.
12. Para control de hongos y bacterias es recomendable realizar aspersiones con formol al 0.3% en volumen, es decir adicionar 3 ml de formol comercial en un litro de agua.
13. Evaluar diariamente el crecimiento micelial, retirar el material contaminado y disponerlo de acuerdo con lo establecido en las metodologías básicas.
14. Cuando la invasión del hongo sea entre el 95 y 100%, sellar la caja de petri con vinilpel, desinfectarla externamente y guardarla en la nevera entre 4 y 6°C.
15. Cuando ocurran contaminaciones lejos del área de crecimiento micelial del hongo, puede realizarse un repique a otras cajas de petri con agar para eliminar el contaminante, y disponer el material contaminado conforme a lo expresado en el presente protocolo.

MANTENIMIENTO DEL CEPARIO



Material biológico de hongos conservado por transferencia

La conservación apropiada de las cepas de hongos es un paso crítico del cual depende en gran parte la continuidad y la calidad de la semilla comercial. El método más común empleado para el mantenimiento del cepario es la transferencia seriada, en la cual se utilizan tubos con agar, en forma de pico de flauta, que permiten conservar mejor el medio fresco y la cepa libre de contaminantes por su boca angosta y su cierre con tapa.

Teniendo el área del laboratorio y la cabina de flujo laminar previamente desinfectada, se realiza el repique de las cepas, utilizando una pequeña cantidad de micelio de un cultivo madre para inocular tubos de agar fresco. Estos cultivos se revisan diariamente, después de incubarlos a 25°C por cinco a siete días, para constatar que no se presenten contaminaciones.

El primer paso consiste en la selección de los cultivos madre, que han estado refrigerados durante tres meses, eligiendo aquellos con un buen crecimiento micelial para transferir el micelio a tubos con medio fresco, y repetir el ciclo de conservación. Es importante resaltar que para conservar el vigor de la cepa debe realizarse un máximo de 6 repiques, rotando el medio de cultivo entre PDA y EMA y conservando la cepa adecuadamente en refrigeración.

En caso de que se presenten contaminaciones microbianas en los tubos de cultivo, éstos deben desecharse de acuerdo a las recomendaciones dadas para el material de desecho y llevar la cuenta de los tubos contaminados para determinar si debe repetirse la siembra. Por lo anterior, la transferencia seriada debe hacerse bajo un estricto control ambiental y con observaciones frecuentes del crecimiento del micelio para maximizar la calidad de la semilla.

PROTOCOLO

1. Cuantificar el número de tubos, botellas de agua destilada estéril, probetas, beakers, erlenmeyers y asas necesarias para el repique.
2. Lavar y esterilizar el material de acuerdo con lo descrito anteriormente en las metodologías básicas de laboratorio.
3. Realizar la limpieza y la desinfección del laboratorio (Ver metodologías básicas de laboratorio).
4. Mantener cerrada la puerta del laboratorio. Mantener una bata limpia, cofia y tapabocas al interior del laboratorio y una bata a la salida para el cambio.
5. Preparar los medios de cultivo utilizando el procedimiento referido anteriormente en este documento.
6. Retirar de la nevera el material de siembra 1 día antes para permitir que se aclimate, desinfectarlo con alcohol.
7. Desinfectar la cabina de flujo laminar o el área de trabajo, encender mecheros y mantener alcohol para la desinfección constante durante el proceso de siembra.



Siembra por transferencia seriada

8. Con el asa trocear el micelio y adicionar un sólo pedazo de inóculo en todo el centro del medio nutritivo de los tubos de cultivo.
9. Por cada cepa repicar el micelio en 5 tubos con EMA y en 5 tubos más con PDA.
10. Rotular el material, anotando la fecha, el tipo de medio, la especie del hongo, la fuente del inóculo y el número del repique.
11. Recoger la basura y limpiar y desinfectar mesones y área de laboratorio después de la siembra. Colocar trampas con formol comercial al 5% en volumen.
12. Incubar los tubos de cultivo a 25°C y evaluar diariamente el crecimiento micelial. Debe retirarse el material contaminado y disponerlo acorde a lo establecido en el presente protocolo para el material de desecho.



Crecimiento micelial en tubos de cepario

13. Cuando la invasión micelial esté entre el 90 y 100%, colocarle vinilpel, a los tubos, desinfectarlos y conservarlos en refrigeración por un tiempo de 3 meses. Al cabo de este tiempo se realiza un nuevo repique pasando el micelio que estuvo conservado en PDA a un tubo con medio nuevo de EMA y los que estuvieron conservados en EMA se transpasan a tubos de cultivo conteniendo como medio nutritivo PDA.
14. Mantener las cepas así conservadas durante 6 repiques, una vez alcanzado este valor, aislar cultivos puros a partir de carpóforos frescos.

CONSERVACIÓN



Termo con nitrógeno líquido para crioconservación de material biológico de hongos comestibles

La adecuada conservación de las cepas garantiza la calidad y continuidad en la producción de la semilla comercial y además mantiene la viabilidad y el potencial productivo de las especies al cultivarlas.

PROBLEMAS, CAUSAS Y SOLUCIONES

PROBLEMAS	CAUSAS	SOLUCIONES
Contaminación microbiana en los procesos de crecimiento micelial	Acumulación de polvo y desinfestación deficiente en el laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza constante • Rotación de desinfectantes
	Deficiencia en la esterilización del material	<ul style="list-style-type: none"> • Lavar y desinfectar correctamente el material. • Verificar temperaturas y tiempos de esterilización descritos en los protocolos
	Manejo inadecuado de la técnica	Revisar el protocolo
	Mala preparación de los medios de cultivo	Preparar los medios de cultivo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante
Mutación o disminución de vigor de la cepa	Cepas aisladas hace más de dos años	Mantener las cepas por un tiempo no mayor a un año y medio
	Mala conservación	Conservar en refrigeración y crioconservación
	Agotamiento de los elementos nutricionales para el hongo	Hacer repiques del cepario cada tres meses
	Utilización de un solo medio para el repique	Realizar la transferencia seriada en diferentes medios de cultivo
Cepas de bajo rendimiento	Cuerpos fructíferos débiles	Seleccionar cuidadosamente los cuerpos fructíferos que tengan las mejores características fenotípicas

LITERATURA CONSULTADA

RODRÍGUEZ V., N. Cultivo de hongos comestibles. Apuntes del trabajo en laboratorio. Chinchiná, Cenicafé. Disciplina Química Industrial. 2001. 152 p.

RODRÍGUEZ V., N; JARAMILLO L., C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus*. Boletín Técnico Cenicafé N° 27: 1-56. 2005.

Mantenimiento de cepas de hongos comestibles y medicinales

Fotografía
Archivo Cenicafé
Archivo Proyecto

Diseño
Martha Liliana Araque Fonseca
Cenicafé
Versión preliminar

Copyright © FNC -Cenicafé 2006

CON EL APOYO DE:



ASOFUNGICOL
Asociación de productores de hongos comestibles de Colombia

