CALDO DE CULTIVO EXPERIMENTAL PARA GANODERMA LUCIDUM.

Johnson, Jorge, EAFIT, jjohnso1@eafit.edu.co
Mayo 21 de 2017

RESUMEN: A partir de la elaboración de 4 cultivos, Ganoderm, Sabouraud, PDB, y Exp, tres de control, y el último experimental, se intentó crear un caldo de bajo costo a partir de malta y de extracto de levadura, buscando alternativas al agar Ganoderm, actualmente costoso de elaborar. El hongo *Ganoderma Lucidium* es útil en la generación de polisacáridos biológicamente activos con potenciales propiedades medicinales. Se sembró el hongo por duplicado en los 4 caldos, con crecimiento de quince días. Se extrajo la biomasa por filtrado y secado. Finalmente se hizo extracción y cuantificación de polisacáridos usando técnicas Dubois, y obteniendo concentraciones para los pares Ganoderm=(485 µg/L ,485 µg/L), Saboreau=(557.5 µg/L, 557.5485 µg/L), PDB=(107.74 µg/L, 195.99 µg/L), Exp=(120.23 µg/L, 103.99 µg/L). Se obtuvieron muy bajos niveles de polisacáridos para ambos caldos, PDB y Exp, asociados finalmente a contaminación por bacteria de la cepa origen del hongo, por lo que se recomienda repetición del procedimiento para PDB y Exp.

ABSTRACT: From the elaboration of 4 fungi soup cultures, Ganoderm, Saboreaud, PDB, and Exp, three for control, and the last experimental, it was tried to have a low cost soup culture from malta and yeast extract, looking for low cost alternatives to Ganoderm culture, actually of a high cost to make. The Fungus *Ganoderma Lucidium* is useful in the generation of biologically active polysaccharides with potential medicinal properties.The Fungus was cultivated in 4 different culture soups, allowing to grow for fifteen days. Its biomass was extracted by filtering and dry. Finally, extraction and quantification of polysaccharides was made by Dubois techniques, getting values for tuples y obteniendo concentraciones para los pares Ganoderm=(485 µg/L ,485 µg/L), Saboreau=(557.5 µg/L, 557.5485 µg/L), PDB=(107.74 µg/L, 195.99 µg/L), Exp=(120.23 µg/L, 103.99 µg/L). Low level values for polysaccharides were obtained for both PDB and Ex soups, finally associated with bacterial contamination of the fungus strain, following this a recomendation for repetition of the procedures for PDB and Exp.

PALABRAS CLAVE / KEYWORDS: PDB, Ganoderma lucidum, Sabouraud, Polisacáridos / PDB, *Ganoderma lucidum*, Sabouraud, Polysaccharides.

1. INTRODUCCIÓN

El hongo *Ganoderma Lucidium* es un hongo bastante popular en el laboratorio y en la industria, debido a sus supuestas propiedades medicinales. Las características químicas de los polisacáridos de Ganoderma incluyen antioxidantes, actividades antitumorales y antimicrobianas (Ferreira IC, Heleno SA, Reis FS, Stojkovic D, Queiroz MJ, et.al. 2015). El hongo puede ser producido de forma simple usando platos petri tradicionales para hacer análisis diversos. Sin embargo, si se desea evaluar su crecimiento y la cantidad de polisacáridos generados, conviene es usar caldos de cultivo en erlenmeyers, de modo que sea posible hacer mediciones apropiadas de la biomasa y los productos generados. Tradicionalmente, la

solución química que muestra un crecimiento muy adecuado, y una generación de polisacáridos bastante apreciable, es el compuesto Ganoderm, agar que, preparado en caldo, o en Petri, da excelentes resultados para el crecimiento del hongo *Ganoderma lucidium*; sin embargo, su alta demanda, acompañada de sus costos, lo hacen de alguna forma desfavorable. También existen otros cultivos muy apropiados para el sembrado de *Ganoderma lucidium*, como el agar Sabouraud, que es agar bastante apto como medio de enriquecimiento para hongos en general. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) es un medio selectivo principalmente usado para aislar dermatófitos, otros hongos, y levaduras, pero puede ser usado también para bacterias filamentosas. El pH ácido de este medio (pH cerca de 5.0) inhibe el crecimiento de bacterias, pero permite el crecimiento e levaduras, y la mayoría de hongos filamentosos. (Rijal, N. 2015). De otro lado está el agar PDB, que es tal vez uno de los medios más utilizados para el cultivo de hongos y bacterias (Harold E. 1998). Teniendo estos tres referentes, se pensó en crear un cuarto agar para caldo, persiguiendo crear una alternativa con malta y levadura: un agar que pudiera ser muy aceptable como alternativa a los ya existentes, y en particular, buscar un agar competitivo con Ganoderm.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Crear un agar competitivo frente a otros tipos de agar universales, elaborado sobre la base a extracto de malta y extracto de levadura, y en particular determinar qué tan comparable es con el agar Ganoderm. Para el efecto, se crearon 4 agares en caldo por duplicado, incluyendo uno no tradicional y tres tradicionales, se sembraron el hongo *Ganoderma Lucidium* en todos ellos, se esperó un crecimiento de 12 a 15 días, y se midió la biomasa final, y los polisacáridos obtenidos, buscando determinar si la hipótesis del nuevo agar creado es válida, esto es, se obtiene un agar comparable y competitivo a Ganoderm

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Crear cuatro agares, tres tradicionales, uno no tradicional, en iguales volúmenes y por duplicado.
- Sembrar el hongo *Ganoderma lucidium* en todos ellos en la misma proporción.
- Dejar en crecimiento todos los sembrados entre 12 y 15 días.
- Extraer y cuantificar los polisacáridos creados por la biomasa del hongo durante su crecimiento.

3. METODOLOGÍA

3.1. LOCALIZACIÓN

Se trabajó en el laboratorio de microbiología de la universidad EAFIT el día viernes 7 de abril desde las 8am hasta las 4pm. La temperatura ambiental de preparación de los caldos fue diversa, dado que se crean en diferentes condiciones, en particular el PDB. La temperatura ambiente era de 21°**C**. Sin embargo, el proceso de dilución varía dado que algunos compuestos el requirieron de mayor temperatura que otros, y en el vórtice.

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Horno, vórtice de apoyo manual, Espectrómetro de masas, Balanza 4 cifras decimales, Autoclave, Sala de Esterilización, 8 erlenmeyers Schott Duran de 400 ml, pHmetro, Agitador de vórtice YELLOW-line, Plato de calor CORNING, Plato Shaker, o agitador orbital, filtros papel, bomba de extracción por filtro, Etanol absoluto 16 ml, NaOH 16 ml sol 1.0N, 20.00 gr de Glucosa anhidra, 3.00 gr de Extracto de Levadura, 3.00 gr de Peptona, 0.10 gr de Sulfato de Magnesio, 0.10 gr de Fosfato de Potasio, 0.01 gr de Vitamina B1, 60.00 gr de Papa pira (infusión), 6.00 gr de Extracto de Malta, Ácido sulfúrico 4 ml, Fenol sol 5% 6.5 ml.

3.3. PROTOCOLOS Y ACTIVIDADES EMPLEADOS

3.3.1. Creación de Caldo Ganoderm.

- Se toman **200 ml** de agua desionizada en Erlenmeyer de 400 ml.
- Se adiciona glucosa anhidra **8 gr**, Extracto de Levadura **1 gr**, Peptona **1 gr**, Sulfato de Magnesio **0.1 gr**, Fosfato de Potasio **0.1 gr**, Vitamina B1 **0.01 gr**
- Mezcla por vórtice para homogeneizar.
- Prueba de pH del caldo con pH metro, la cual deberá estar cerca **5.5**. Se obtuvo por pHmetría **5.6**, y se conservó el valor por ser adecuado.
- Separación de mezcla en dos Erlenmeyer por partes iguales, 100 ml y 100 ml.
- Tapado de los Erlenmeyer con Tapón de gasa.
- Cinta marcando los Erlenmeyer para identificación del caldo.

3.3.2. Creación de Caldo PDB.

- Se toman **200 ml** de agua desionizada en los Erlenmeyer de 400 ml.
- Se adiciona glucosa anhidra **4 gr**, Papa pira (infusión) **60 gr.**
- Para la preparación de infusión de papa pira se siguió el siguiente procedimiento:
    - Se tomaron **60 gr** de papa cortada en trozos pequeños en beaker de 400 ml. Se adicionaron **200 ml** de agua desionizada. Se puso a calentar hasta hervir, en plato de calor. El beaker se tapó con tapa de vidrio para evitar evaporación excesiva del compuesto.
    - Luego usando filtro a presión con bomba, se extrajo la masa de la papa.
- Mezcla por vórtice para homogeneizar.
- Separación de mezcla en dos Erlenmeyer por partes iguales, 100 ml y 100 ml.
- Tapado de Erlenmeyer con Tapón de gasa.
- Cinta marcando los Erlenmeyer para identificación del caldo.

3.3.3. Creación de Caldo Sabouraud.

- Se toman **200 ml** de agua desionizada en Erlenmeyer de 400 ml.
- Se adiciona glucosa anhidra **8 gr**, Peptona **2 gr.**
- Mezcla por vórtice para homogeneizar.
- Separación de mezcla en dos Erlenmeyer por partes iguales, 100 ml y 100 ml.
- Tapado de Erlenmeyer con Tapón de gasa.
- Cinta marcando los Erlenmeyer para identificación del caldo.

3.3.4. Creación de Caldo EXPerimental.

- Se toman **200 ml** de agua desionizada en erlenmeyer de 400 ml.
- Se adiciona extracto de Malta **6 gr**, Extracto de levadura, **1 gr.**
- Mezcla por vórtice para homogeneizar.
- Separación de mezcla en dos Erlenmeyer por partes iguales, 100 ml y 100 ml.
- Tapado de los Erlenmeyer con Tapón de gasa.
- Cinta marcando los Erlenmeyer para identificación del caldo.

3.3.5. Paso a autoclave.

Todos los 8 erlenmeyer tapados se llevan a autoclave. También un tubo de ensayo para las muescas del hongo a ser sembradas se llevó al autoclave. Duración autoclave: 40 minutos

3.3.6. Sembrado de hongo *Ganoderma lucidium* en los diferentes caldos.

- La localización para el sembrado fue en una sala de esterilización.
- Se sembraron dos cepas de hongos en cada uno de los Erlenmeyer. Los cortes se hicieron con muesca de tubo de ensayo esterilizado para garantizar una proporción similar del hongo en cada caldo. En total fueron 16 muescas para los 8 caldos, dos por caldo.
- *Todos los Erlenmeyer pasan a agitador orbital durante 14 días exactos, entre el 7 de abril, y el 21 de abril.*

3.3.7. Extracción y peso de biomasas (14 días después).

- Se suspende la agitación de los caldos en el agitador orbital.
- Se pesan filtros de forma individual para cada Erlenmeyer.
- Se filtra la biomasa de cada caldo usando filtro papel y bomba.
- Se pesan filtros con biomasa y se resta la diferencia, para obtener el peso de las masas *(ver resultados en tabla 1)*.
- En algunos casos se rompió el filtro, y hubo que adicionar filtros adicionales al proceso de filtrado. Los filtros adicionales se deben considerar, como se ve en la *tabla 1*.
- Filtros con biomasa secados en horno a 40°**C** durante 24 horas.

3.3.8. Concentración de Polisacáridos.

- Paso como parte el protocolo de ***extracción de polisacáridos de Dubois*** (DuBois M., Gilles, K, Hamilton J., Rebers P., Smith F. 1956).
- Extracción de **0.5 ml** de cada uno de los caldos, y adición de **2 ml** de Etanol. *NOTA: Los caldos PDB y EXP presentan turbulencia, lo que puede ser indicio de contaminación. Debido a ello, antes de la extracción se centrifugan durante 10 minutos, a 14.000 rpm para eliminar células adicionales y poder extraer sólo polisacáridos.*
- Cada extracción se llevó a tubo plástico cerrado.
- Todos los 8 tubos pasan a centrifugado durante 20 minutos, a 4500 rpm.
- Luego del centrifugado, los polisacáridos están en el fondo de los tubos plásticos. Se elimina el etanol sobrenadante. Y sólo queda el concentrado.

3.3.9. Resuspensión de Polisacáridos.

- Paso como parte el protocolo de ***extracción de polisacáridos de Dubois*** (Dubois, M. 1956).
- A cada concentrado, Se adicionan 2 ml de NaOH solución 1M.
- Se pasan los tubos a vórtice de apoyo manual.
- Paso de todos los tubos a baño maría durante 50 minutos, a 60°**C**.
    - NOTA: Al retirar los tubos del baño, adición accidental de agua a **Exp #1** hasta 9.5 ml. (se pasó de los 2 ml iniciales, a 9.5 ml en el accidente).

3.3.10. Cuantificación de Polisacáridos.

- Paso como parte el método de ***cuantificación de polisacáridos de Dubois*** (Dubois, M. 1956).
- Paso a tubo de ensayo de vidrio de **50 µL** de cada una de la resuspensión de polisacáridos (8 tubos).
- Adición a los 8 tubos de ensayo de **950 µL** de H_2O desionizada.
- Adición de un(1) nuevo tubo de ensayo, el blanco (referencia), con 1 mL de H_2O desionizada.
- Adición de cuatro(4) nuevos tubos de ensayo, con suspensiones sin agua de los caldos PDB #1, PDB #2, EXP#1, EXP#2, debido a un posible bajo nivel de polisacáridos, de forma que se haga un control por fuera de la mezcla con agua, y estén sólo con NaOH. *NOTA: Se detectaron 4 caldos comprometidos, precisamente los últimos 4 procesados en esterilización, y también los mismos de motivo de estudio, ya que se detectó el caldo turbio en ellos con muy poca transparencia, lo que evidencia bacteria, a pesar que se evidencia visualmente presencia de hongo. Se decide proceder con los procedimientos de forma normal, con adición de nuevos controles como el que se plantea.*
- Adición a los 13 tubos de 500 µl de Fenol a 5%.
- Adición a los 13 tubos de 2.5 ml de Ácido sulfúrico [H_2SO_4].
- Volumen final de las soluciones es 4 ml.
- Dejar 10 minutos fuera del alcance de la luz.
- Llevar a baño maría a 30 grados durante 30 minutos.
- Leer absorbancia en espectrógrafo a 492 nm, usando calibración por ***método DUBCR***, con ecuación para absorbancia de $\mathbf{A} = \boldsymbol{0X^2 + 0.01386x - 0.03727}$, con coeficiente de correlación de 0.9995.

4. CÁLCULOS Y RESULTADOS

El factor *de dilución FD_1, correspondiente a extracción de polisacáridos, desde fuente 0.5 ml de cada uno de los caldos, y adición de 2 ml de Etanol, es FD_1 = 2.5 / 0.5 = 5.*

El factor de dilución FD_2, correspondiente a la cuantificación, de 50 µl de cada una de la resuspensión de polisacáridos, y adición 950 µl de H2O desionizada, es FD_2 = 1000 / 50 = 20. El factor de dilución final es de FD_1 x FD_2 = 100.0. El factor de dilución final para los 4 casos extras de control sin dilución, será sólo de FD_1 = 5.

El factor de dilución ***$FD_{2'}$***, correspondiente a la *cuantificación,* de **50 µL** de cada una de la resuspensión de polisacáridos, y adición **950 µL** de H_2O desionizada*, y con adición accidental de agua hasta alcanzar los 9.5 ml, es **$FD_{2'}$** = 1000 / 50 * 9.5 / 4 =* ***47.5****. NOTA:* Los 4 ml corresponden a la adición de 0.5 ml de fenol, y 2.5 ml de Sulfúrico al mililitro inicial.

4.1. TABLAS

La tabla que se presenta a continuación son los resultados del peso de las biomasas.

Tabla 1. Peso de Filtros y Biomasas Calculadas. (en gramos)

Caldo	Peso Biomasa [gr]
Ganoderm 1	0.4849
Ganoderm 2	0.3571
Saboreaud 1	0.2457
Saboreaud 2	0.1614
PDB 1	0.1603
PDB 2	0.1091
EXP 1	0.0966
EXP 2	0.0575

La tabla que se presenta a continuación son los resultados de la cuantificación, luego de la extracción. Leer absorbancia en espectrógrafo a 492 nm, usando calibración por **método DUBCR**, con ecuación para absorbancia **$A = 0X^2 + 0.01386x - 0.03727$**, con coeficiente de correlación de 0.9995.

Tabla 2. Absorbancias a 492 nm, y concentración según factores de dilución.

Tabla 2. Absorbancias a 492 nm, y concentración según factores de dilución.

Muestra	ABS	Concentración Polisacáridos [µg / L] = (Absorbancia + 0.03727) / 0.01386	Masa Final *(Aplicando Factores de Dilución) FD_1 x FD_2 = 100.0*
Ganoderma 1	0.030	4.8500	485 µg / L
Ganoderma 2	0.030	4.8500	485 µg / L
Saboreaud 1	0.040	5.5750	557.5 µg / L
Saboreaud 2	0.040	5.5750	557.5 µg / L
PDB 1****	0.035		
PDB 2	0.047	6.0800	600** µg / L
Exp 1	0.034	172.240	8181.4*** µg / L
Exp 2	0.014	12.790	1279** µg / L

Los siguientes valores corresponden a las 4 tomas de los Erlenmeyer contaminados. NOTA IMPORTANTE: Sólo se tendrá en cuenta el **FD_1**

PDB1 Sin diluir	0.261	21.520	107.70 µg / L
PDB 2 Sin diluir	0.506	39.197	195.99 µg / L
EXP 1 Sin Diluir	0.296	24.045	120.23 µg / L
EXP 2 Sin Diluir	0.251	20.798	103.99 µg / L

* El tubo de dilución PDB #1 fue comprometido con material orgánico, y se decide eliminarlo.
** error en las muestras presumiblemente debido a contaminación del hongo con bacterias.
*** Se usa un factor de dilución diferente de 47.5 debido al ingreso de agua.
**** Se elimina por impurezas orgánicas.

5. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Aparecen algunos datos interesantes, como el hecho que el caldo Sabouraud 1 y Sabouraud 2, con 557.5 µg/L cada uno, tuvieron un comportamiento mejor que el caldo Ganoderm con 485 µg / L cada una de las instancias, cuando, en realidad, se esperaba mayor producción de polisacáridos con Ganoderm. Esto contrasta con los valores de las masas de *Ganoderma lucidum*, la cual fue superior para Ganoderm con instancias de 484.9 µg y 357.1 µg, sobre Sabouraud con

instancias de 245.7 µg y 161.6 µg respectivamente, de donde, a pesar de crecer más biomasa del hongo en el medio Ganoderm, hay mayor efectividad de polisacáridos con Sabouraud. Finalmente se debe decir que se pueden presentar errores importantes si no se cuenta con la experiencia adecuada, ya que hay muchos puntos donde las mediciones de pesos y volúmenes son fundamentales, y donde los tiempos y factores de temperatura son cruciales. Se debe entrar a vigilar cuidadosamente las Cepas origen antes de su uso, y no confiar en su calidad, ya que el tiempo que se invierte puede perderse parcial o totalmente.

Luego de pasados los 15 días de crecimiento el hongo en los Erlenmeyer, se retiraron del agitador orbital, se detecta que la transparencia de los 2 Erlenmeyer con Ganoderm y los dos Erlenmeyer con Sabouraud, presentaban un caldo transparente, y el hongo se evidenciaba correctamente. Esta transparencia es característica de un caldo sin contaminación. Por otro lado, se detectan 4 caldos comprometidos, precisamente los últimos 4 procesados en esterilización, que presentan turbidez. Estos últimos comprometidos, son también los mismos del motivo de estudio. Se decide proceder con los procedimientos de forma normal, con adición de nuevos controles. Finalmente, los resultados obtenidos arrojan datos que no pueden ser contrastados efectivamente debido a la contaminación, pues se desvirtuaron precisamente los caldos PDB 1 y 2, y EXP 1 y 2. En particular, los caldos EXP 1 y EXP 2 eran sujeto de estudio, pero la contaminación evita conclusiones importantes sobre ellos. El análisis de la contaminación se rastreó en muchos aspectos siguiendo toda la pista de las actividades, desde la creación de los caldos, hasta la siembra misma, y si suponemos que contamos con toda la información adecuada y fiable, la contaminación venía en el hongo, lo que contrasta perfectamente con que fueron 4 Erlenmeyer consecutivos los fueron los contaminados, debido a la secuencia de las muescas en el Petri con la cepa del hongo.

Dado que el agar PDB fue uno de los contaminados, se pierde la posibilidad de analizar otro competidor importante, ya que el PDB es tal vez uno de los medios más utilizados para el cultivo de hongos y bacterias (Harold E. 1998).

6. CONCLUSIONES

Dado el resultado de superioridad de Sabouraud sobre Ganoderm, se ve interesante hacer un trabajo con estos dos tipos de agares, para determinar si hay algunas variedades de cepas de *Ganoerma lucidum* que responden mejor, o si simplemente Sabouraud está ofreciendo mejores resultados, o si se trata sólo de una casualidad. Sabouraud es muy competitivo, y al menos en esta experiencia mostró estar por encima del especializado agar Ganoderma en un 15%, como se evidencia de los resultados, con 557.5 µg/L sobre el Ganoderm con 485 µg / L. Eso significa que dicho genérico de uso para bacterias y hongos, podría usarse para reemplazar al Ganoderm en muchas situaciones.

Luego de analizar toda la evidencia sobre la fuente de contaminación de los caldos PDB1, PDB2, Exp1 y Exp2, la respuesta más plausible es que con una alta probabilidad, un sector del agar en el plato Petri donde estaba la cepa origen *Ganoderma lucidum*, estaba infectada con bacterias, lo que no fue evidente al momento el sembrado. Se habla de un sector ya que se usó un solo plato Petri para todas las 16 muescas de origen para los sembrados. Debido a la contaminación de los caldos PDB y Exp, esta investigación no es concluyente, y debe repetirse. Se recomienda entonces la repetición de estos dos últimos caldos bajo las condiciones planteadas.

Dado que el agar PDB fue uno de los contaminados, se pierde la posibilidad de analizar otro competidor importante, ya que es tal vez uno de los medios más utilizados para el cultivo de hongos y bacterias (Harold E. 1998).

7. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos muy especiales a Sigifredo Cárdenas, coordinador del laboratorio de Microbiología de la Universidad Eafit, por apoyar técnicamente la idea y los procedimientos. Sin el apoyo de Sigifredo, la elaboración de esta investigación preliminar hubiera sido mucho más compleja.

8. REFERENCIAS

Cárdenas, S. (2017). *Conversaciones sobre el posible proyecto, y orígenes de los documentos de protocolos EAFIT modificados para Técnicas Dubois*. Laboratorio de Microbiología. EAFIT.

DuBois M., Gilles, K, Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Recuperado: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017?journalCode=ancham.

Ferreira IC, Heleno SA, Reis FS, Stojkovic D, Queiroz MJ, Vasconcelos MH, et.al. (2015). *Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities.* Phytochemistry. (114), 38-55. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25457487#

Harold Eddleman, Ph. D (1998). *Making Bacteria Media from Potato*. Indiana Biolab. disknet.com. Retrieved 2011-03-04. Recuperado mayo 17 de 2017: http://www.disknet.com/indiana_biolab/b029.htm

Rijal, N. (2015). *Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Principle, composition, uses and colony morphology*. Recuperado desde:https://microbeonline.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-principle-composition-uses-colony-morphology/. Recuperado: Mayo 21 de 2017.

ANEXOS

Se anexan fotografías como evidencia del trabajo en el laboratorio.