

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

UTILIZACION DE BOLSAS DE POLIPAPEL Y CELOFAN PARA EL
EMPAQUE DE LOS INOCULOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE
UNA CEPA MEXICANA DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.)
INOCULADA SOBRE SORGO (*Sorghum bicolor*)

Informe de Tesis

Presentado por

HECTOR RIGOBERTO ARRIOLA HIGUEROS

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, octubre de 1996.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
T(1443)

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR	DECANO
LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA	SECRETARIO
LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ	VOCAL I
LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN	VOCAL II
LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSÉ	VOCAL III
BR. ANA MARIA RODAS GARCIA	VOCAL IV
BR. JAIRO OSWALDO GARCIA GARCIA	VOCAL V

TESIS QUE DEDICO A

- DIOS** Por guiar mis pasos a lo largo de mi vida y darme sabiduría para culminar mi carrera.
- MIS PADRES** Rigoberto Arriola Marroquín
Gloria Elizabeth Higueros de Arriola
Por el amor y apoyo que me han brindado y a quienes en realidad pertenece este triunfo.
- MIS HERMANOS** Hugo y Ruth
Por estar siempre a mi lado brindándome su estímulo y mano amiga
- MI ABUELITA** Diega Oroxóm Pisquiy
Por sus consejos y amor
- MIS PRIMOS** Hugo Rafael Oroxón Mérida
Gilmara Elizabeth García Arriola
Por su constante colaboración
- MI NOVIA** Claudia Rosario Menchú Rosal
Por el apoyo, paciencia y amor que me ha brindado.
- MIS AMIGOS** Anjeanette, María Elena, Rosita, Carmen Rosa, Anayte, Leslie, Sergio, Byron, Cecilia, Germán y Vinicio.
Que estuvieron conmigo y me manifestaron su colaboración y apoyo moral en aquellos momentos de gran necesidad

AGRADECIMIENTOS

A la Licda. Karin Larissa Herrera Aguilar, por su amistad, colaboración y asesoría de este trabajo de investigación.

A la Licda. María del Carmen Bran González, por su amistad y consejos.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, especialmente a Luis, César y Olga.

A los licenciados Heidi Logemann, Blanca Samayoa y Jorge Luis de León, por la revisión de este trabajo.

Al personal de secretaria de la Escuela de Química Biológica, en especial a Lucy y Lesbia.

INDICE

1.	Resumen.....	01
2.	Introducción.....	03
3.	Antecedentes.....	04
	3.1 Generalidades.....	04
	3.2 Características del género <i>Pleurotus</i>	04
	3.2.1 Morfología.....	04
	3.2.2 Nutrición.....	05
	3.2.3 Reproducción.....	05
	3.3 Importancia de los hongos comestibles.....	05
	3.4 Cultivos de hongos comestibles.....	06
	3.5 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	06
	3.5.1 Obtención del micelio.....	07
	3.5.2 Preparación del inóculo "primario".....	08
	3.5.3 Preparación del inóculo "secundario".....	09
	3.6 Empaques utilizados para la preparación de inóculos.....	09
	3.7 Manejo del inóculo.....	10
	3.8 Problemas en la elaboración del inóculo.....	10
4.	Justificación.....	12
5.	Objetivos.....	13
6.	Hipótesis.....	14
7.	Materiales y Métodos.....	15
8.	Resultados.....	18
9.	Discusión de Resultados.....	22
10.	Conclusiones.....	24
11.	Recomendaciones.....	25
12.	Referencias.....	26
13.	Anexos.....	29

1. RESUMEN

El cultivo comercial del género *Pleurotus*, requiere de un proceso sencillo con tecnología no sofisticada, que involucre el mantenimiento de las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo.

Los inóculos (primario y secundario), constituyen la base para el cultivo comercial de *Pleurotus*. Para la elaboración de éstos, se emplean granos o semillas de gramíneas empacadas en frascos o botellas de vidrio, sin embargo, estos sistemas se rompen con mucha facilidad y pueden causar serios accidentes de laboratorio. Ante esta situación, la industria productora de hongos comestibles busca otras alternativas que se puedan emplear para empacar los inóculos.

En este estudio, se elaboraron 105 inóculos primarios de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.). El micelio de micelio de este hongo fue sembrado sobre porciones de 250grs. de sorgo empacado en tres diferentes sistemas: Frascos de vidrio (control), Bolsas de polipapel y celofán.

Para las finalidades del estudio, éste se dividió en dos fases. Durante la primera, se evaluó el comportamiento de las bolsas en cuanto a su resistencia al calor. Y en la segunda fase, se evaluó el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en los sistemas antes mencionados.

Los resultados obtenidos en la primera fase del estudio, revelaron que tanto las bolsas de celofán como los frascos de vidrio, son poco resistentes al calor, por lo que pueden no ser adecuados para empacar los inóculos.

En el caso de las bolsas de celofán, éstas se vuelven sumamente frágiles después de ser esterilizadas y deben ser manejadas con extremo cuidado para evitar que se rompan.

En cuanto a los frascos de vidrio, éstos se templan por el cambio brusco de temperatura que sufren al ser retirados del autoclave, y por lo tanto se vuelven sumamente frágiles y deben ser manipulados con extremo cuidado.

Por último las bolsas de polipapel, pueden convertirse en un sistema alterno para empacar los inóculos, ya que éstas no presentaron ningún daño.

En cuanto a la segunda fase, en ésta se observó que el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en las bolsas de polipapel y celofán, es similar al observado en el sistema control (frascos), sin embargo, la manipulación de la semilla es mucho más fácil de llevar a cabo cuando se emplean bolsas para empacar los inóculos.

Se utilizó una cepa mexicana de *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.), la cual fue sembrada sobre 35 porciones de 250 grs. de sorgo por cada sistema estudiado. Como control se utilizaron frascos de vidrio, ya que éstos son los comúnmente empleados por la industria productora de hongos comestibles en la fabricación de los inóculos.

El estudio se dividió en dos fases. Durante la primera, se evaluó el comportamiento de las bolsas en cuanto a su resistencia al calor. Y en la segunda, se evaluó el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en los sistemas antes mencionados.

Los resultados obtenidos en la primera fase, revelaron que tanto las bolsas de celofán como los frascos de vidrio, son poco resistentes al calor, por lo que pueden no ser adecuados para empacar los inóculos.

En cuanto a la segunda fase, en ésta se observó que el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en bolsas de polipapel y celofán, es similar al observado en el sistema control, sin embargo en cuanto a la manipulación de la semilla, ésta es mucho más fácil de llevar a cabo cuando se emplean las bolsas.

2. INTRODUCCION

Entre los hongos macromicetos, los comestibles han llamado la atención desde tiempos remotos. En la actualidad juegan un papel muy importante en la economía de algunos países, ya que son considerados como suplemento alimenticio debido a su composición nutricional. Otro aspecto que confirma su importancia, es el hecho de que algunos sustratos donde se cultivan, puede ser utilizado como forraje para el ganado.

El género *Pleurotus* ha cobrado especial importancia, gracias a su fácil adaptación y manejo para su cultivo comercial. Su cultivo a nivel de laboratorio fue iniciado en Guatemala en el año 1983 por Ruth De León y colaboradores. A la fecha, se buscan nuevas alternativas para empacar para empacar el grano que se utilizará como sustrato intermedio en la producción de inóculos primarios y secundarios.

Con este estudio se pretende encontrar nuevas alternativas de contención del grano a utilizar en la producción de inóculos primarios y secundarios, utilizando para ello una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus*. (Jac.: Fr.), la cual será inoculada sobre sorgo contenido dentro de bolsas de polipapel y celofán, dado que el uso de recipientes de vidrio como contenedores o empaque del grano resultan inapropiados para el manejo del mismo, sino que también incrementa los costos de producción de los inóculos y en algunas ocasiones pueden causar serios accidentes de laboratorio cuando se rompen.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades.

El Reino de los hongos o Reino Fungi conforma un enorme grupo independiente al de las plantas y el de los animales como lo hiciera ver Whittaker (1969) y recientemente Herrera y Ulloa (1990), en el cual pueden encontrarse variedades macro y microscópicas que comparten características semejantes (1-3).

Los macromicetos pertenecen a una división conocida como hongos verdaderos. Se reproducen sexual y/o asexualmente, produciendo cuerpos fructíferos de diferentes colores formas y tamaños, los cuales pueden ser comestibles o no comestibles por su textura y consistencia, tóxicos y destructores de madera (4-6).

En base a su reproducción sexual, los hongos se agrupan en dos clases: **Ascomycetes y Basidiomycetes**, siendo esta última clase la más evolucionada y desarrollada, ya que los hongos que ésta comprende, producen sus esporas en estructuras conocidas como basidios, los cuales se encuentran en cuerpos fructíferos altamente organizados llamados basidiocarpos (Anexo 1; 7-9).

3.2 Características del género *Pleurotus*.

3.2.1 Morfología:

El género *Pleurotus*, posee un píleo (sombrero) que mide de 4 a 15 cms. o más de ancho, presentando forma de ostra, de convexo a plano y en algunas ocasiones con forma de embudo, su superficie es lisa, suavemente lubricada cuando está húmedo, pero no viscosa. Su color es variable, de blanco a gris, grisáceo-café, canela o café oscuro, algunas veces amarillento cuando el espécimen es viejo. Las orillas del píleo están enrolladas cuando el hongo es joven, siendo frecuentemente onduladas o lobuladas. En cuanto a la textura, ésta es firme pero blanda, haciéndose más dura en el estípote (pie) (4).

2.3 Nutrición:

En función de su nutrición el género *Pleurotus* se clasifica como saprófito, ya que se alimenta de materia orgánica muerta, principalmente de material ligno-celulósico (3,6,10)

3.2.3 Reproducción:

La reproducción del género *Pleurotus* es asexual, la cual involucra tres etapas:

- Plasmogamia, unión de dos protoplastos con acarreo de núcleo solamente o el paso de protoplasto completo.
- Cariogamia, fusión del núcleo de un micelio con el de otro.
- Meiosis, división que vuelve haploide a las esporas y además asegura la recombinación genética (7,8).

Un mecanismo interesante que se halla en los tipos mas importantes de Basidiomycetes, tal es el caso del género *Pleurotus*, opera en unas estructuras llamadas **Fíbulas**, las cuales se forman durante la división nuclear, para asegurar que los núcleos hermanos que nacen de la división conjugada del dicarionte, se distribuyan en las dos células hijas (Anexo 2; 7,8)

3.3 Importancia de los hongos comestibles.

La importancia de los hongos comestibles radica en su valor nutritivo. Según estudios realizados por especialistas en alimentos, los hongos contienen mucha más proteínas que los vegetales, con excepción de la soya, carne, huevos y leche (11).

En el género *Pleurotus* el contenido de aminoácidos esenciales es similar al de la carne, pero inferior en isoleucina, leucina, lisina e histidina (11,12). En cuanto a vitaminas, los hongos son fuente de tiamina (Vit. B1), riboflavina (Vit. B2), ácido pantoténico, niacina, biotina, ácido ascórbico (Vit. C), entre otras. Se ha detectado en *Pleurotus ostreatus* la presencia de ergosterol, que es precursor de la Vitamina D2 o ergocalciferol a través de reacciones fotoquímicas. A partir de 8.5 Kg. de hongos frescos se obtienen 220 mg. de ergosterol (0.028% H.S.) (13-15).

El género *Pleurotus* al igual que otras especies de hongos comestibles contiene cantidades apreciables de minerales como potasio, fósforo, cobre y hierro entre otros; además es un alimento bajo en grasa y carbohidratos (12,14,15).

Otro aspecto que confirma la importancia de los hongos comestibles en la economía nacional, es su valor como forraje. Para este propósito no es considerado el cuerpo fructífero, pero si el substrato lleno de micelio. Este microfraje puede ser hecho con desechos agroindustriales y por productos, los cuales de otro forma no son buenos para la alimentación del ganado (16,17).

3.4 Cultivo de hongos comestibles.

Tomando en cuenta la domesticación puede decirse que hay dos tipos de hongos comestibles: Aquellos que se producen comercialmente debido a que son cultivados y aquellos que sólo pueden ser colectados en la época de lluvia (3,18,19).

Sólo los hongos saprófitos han podido ser cultivados comercialmente, tal es el caso del género *Pleurotus*, siendo las especies *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. sajor-caju*, *P. florida* y *P. sapidus*, las que más se han cultivado para fines comestibles (11,20,21).

3.5 Cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

El cultivo de *P. ostreatus* se inicio en Europa y se ha ido extendiendo al Asia y E.U.A. y hace apenas unos años en América Latina. Gracias a su fácil adaptación, manejo y bajos costos en el cultivo, es el hongo que día a día se cultiva más comercialmente y poco a poco desplaza a los mercados internacionales de las especies competitivas, como el champiñón (*Agaricus bisporus*), el shiitake (*Lentinus edodes*) y otros (3,16).

El cultivo, requiere de un proceso sencillo con tecnología no sofisticada que involucra el mantenimiento de las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo (22). El crecimiento de este género está supeditado a ciertos factores como son: la temperatura (25-28 °C), la

humedad del ambiente (90-100%); la humedad del sustrato (45-55%), el pH (6.8-7), las concentraciones de CO₂ (20%) y O₂ y la luz (En completa oscuridad cuando se trata de producir inóculos). Las condiciones más adecuadas de estos factores dependen del tipo de desarrollo que se busca del hongo, si es para crecimiento del micelio o para propiciar la fructificación (3,11,22).

3.5.1 Obtención del micelio.

Para obtener el micelio, lo primero que hay conseguir es aislar la especie de hongo que se desea cultivar. Esto se puede lograr a partir de las esporas que produce el hongo o utilizando una porción del píleo (sombbrero) del espécimen (22-24).

Para obtener las esporas se coloca el sombrero del espécimen en su posición natural, es decir con las laminillas hacia abajo, sobre una cartulina o vidrio. Si el ejemplar no está bien fresco, conviene ponerle encima un algodón húmedo. Después de transcurridas algunas horas se observa sobre la cartulina una especie de polvillo, que en realidad son miles de esporas, las que tendrán un color en particular dependiendo de la especie de hongo. A ese proceso se le conoce como "esporada" (Anexo 3, 11,25).

Para hacer la siembra en el medio del cultivo elegido (agar Extracto de Malta, agar Papa-Dextrosa, agar Sabouraud, etc.), basta con tocar la esporada con un asa de nicrom y después la superficie del medio (22).

Otro procedimiento con esporas consiste en hacer que estas caigan directamente desde el píleo al medio de cultivo (22). Para lograr esto, sobre una caja de petri que contiene el medio elegido se coloca un soporte que mantiene el sombrero del hongo en el centro y se cubre con un tazón grande o una campana de cristal. Al cabo de poco tiempo algunas esporas habrán caído y se procede a tapar la caja (22). La siembra también puede hacerse con tejido del hongo. Para ello se procede a cortar longitudinalmente el espécimen, después se corta una pequeña porción de la parte que está cerca del sitio donde se une el píleo con el estípote, y con la ayuda de unas pinzas se coloca sobre el medio de cultivo elegido (Anexo 4; 22).

Una vez realizada la siembra sobre el medio de cultivo, se incuba a 25-28 °C durante 8 días aproximadamente y en oscuridad (11,22,23,26).

3.5.2 Preparación del inóculo "primario".

Esta etapa se efectúa bajo extremo cuidado y en condiciones de laboratorio, ya que constituye la base para el cultivo comercial del hongo (3,11).

Consiste en la siembra y propagación del micelio del hongo sobre un sustrato determinado como lo pueden ser granos o semillas de gramíneas y otros materiales dentro de frascos, botellas o bolsas de polipapel. El grano o semilla, no es solamente un vehículo para la distribución uniforme del micelio, sino también un suplemento nutricional (3,11,23-25).

Para la selección de las semillas o granos que se emplearán como sustrato en el inóculo, es necesario considerar su disponibilidad, bajo costo, tiempo de almacenamiento y humedad de las mismas, así como que estén libres de contaminación biológica y/o química (3,11,22).

El grano elegido como sustrato intermedio se limpia, se rehidrata en agua pura limpia (durante 15-18 horas para el caso del sorgo), (Sorgo, ver Anexo 5), después se deja escurrir para eliminar el exceso de agua, ya que mientras más alto sea el contenido de agua, se promoverá la presencia de contaminantes y por el contrario, la baja hidratación repercutirá en un lento crecimiento del micelio (3,11,24,25).

Una vez escurrido el grano, se pesan porciones de 200 grs. y se introducen en frascos, botellas o bolsas de polipapel. Posteriormente se esterilizan a 121 °C y/o 15 lbs./plg² de presión durante 20 a 40 minutos, se deja enfriar para después inocularlo en condiciones de asepsia rigurosa con micelio cultivado sobre agar. Una vez inoculado, cada porción de grano debidamente empacada se incuba a 28 °C y en completa oscuridad (Anexo 6; 3,11,25).

A cada porción preparada en la forma descrita anteriormente se le denomina inóculo "primario" (25). Este método de elaboración de inóculos fue ideado por Sinden en 1932 y perfeccionado por Estoller en 1962 (3,11).

3.5.3 Preparación del inóculo "secundario".

A partir de un primario, en el cual debió haberse desarrollado satisfactoriamente el micelio se pueden tomar estérilmente 8-10 porciones de grano para ser resembradas en el mismo número de recipientes que contengan el sustrato intermedio estéril (Anexo 6; 3,11,25).

Estas nuevas porciones se incuban en las mismas condiciones que los primarios y realizando inspecciones periódicas. Después de transcurridos 10 días, se determina la dispersión del micelio y una

vez crecido éste, a estos segundos paquetes de grano se les denomina "secundarios" (25).

La utilización de "secundarios" como semilla para la siembra del sustrato definitivo es ampliamente recomendada porque disminuye el consumo de agar y medios sintéticos, la propagación del hongo en el secundario es más rápida a razón de estar ya adaptado al grano, se puede inocular mayor cantidad de porciones y porque la transferencia de primario a secundario es más sencilla y menos delicada que la transferencia de caja de petri a a primario (3,11,25).

3.6 Empaques utilizados para la preparación de inóculos.

Tradicionalmente se utilizaban frascos de vidrio para contener el grano, en la actualidad su uso se ha descontinuado, ya que éstos fácilmente pueden romperse y causar serios accidentes de laboratorio. La industria productora de hongos comestibles utiliza bolsas de polipropileno o polimetilpenteno con o sin microporos, sin embargo, el uso de dichas bolsas es crítico, ya que éstas al entrar en contacto con superficies calientes pueden volverse elásticas, deformarse y romperse (11,25).

Las bolsas de celofán merecen una reexaminación desde que son hechas de

celulosa y completamente biodegradables, ya que la ventaja de éstas, es de que el micelio del hongo eventualmente consume su propia bolsas durante la incubación (25).

Las ventajas de utilizar bolsas durante la producción de inóculos son:

- Dado el espacio tan limitado del autoclave, más grano puede ser esterilizado cuando se utilizan bolsas en lugar de frascos de vidrio.
- Si la bolsa se rompe, ésta no es peligrosa como un frasco de vidrio.
- Cuando las bolsas son flexibles, la semilla puede ser más fácilmente desbaratada se semillas individuales y distribuidas dentro del siguiente substrato (25).

Si los problemas en la integridad de la costura y la tolerancia al calor pueden ser perfeccionados, el empleo de bolsas como contenedores del grano en la producción de inóculos, podría convertirse en un sistema favorable (25)

3.7 Manejo del Inóculo.

Una vez obtenido el inóculo secundario éste se encuentra listo para su siembra en el sustrato definitivo que se haya elegido. Si fuera necesario el almacenamiento del inóculo deberá realizarse a 5 °C y en la oscuridad, de lo contrario habrá posibilidad de que se desarrollen las fructificaciones en los frascos o bolsas, lo que le restaría vigor a dicho inóculo. Se recomienda que el tiempo de refrigeración no sea mayor de 6 meses, debido a que el micelio se puede envejecer y compactar (3,11).

3.8 Problemas en la elaboración del inóculo.

Durante la elaboración de los inóculos se pueden presentar algunos detalles, los cuales repercutirán en la calidad de los mismos, por ejemplo, cuando la presión del esterilizador se baja rápidamente o si las bolsas o frascos se metieron muy apretadamente, puede repercutir ello en que los frascos o bolsas de polipapel se rompan al abrirse; ausencia de separación de los granos entre sí dentro de las bolsas o frascos, contaminación de los

granos antes de la inoculación, poco o nulo crecimiento del micelio en los granos, contaminación después de la inoculación, etc (3,20,30).

Algunas de las causas comunes de la lenta colonización incluyen: 1. Una mezcla desbalanceada (grano-agua), 2. Contaminantes, 3. Utilización de cepas débiles, 4. Residuos de fungicidas en el grano, 5. Que el grano sea de mala calidad, etc (25).

4. JUSTIFICACION

En la producción comercial de *Pleurotus ostreatus*, el grano empleado en los inóculos es tradicionalmente empacado en frascos o botellas de vidrio, lamentablemente este sistema ha resultado insatisfactorio, ya que aparte de dificultar la manipulación de la semilla y ocupar mucho espacio en los equipos de laboratorio, pueden causar serios accidentes de laboratorio cuando se rompen.

Actualmente en nuestro medio no se cuenta con información sobre el empleo de nuevas alternativas para el empaque de los inóculos, por lo que con este estudio se utilizarán bolsas de polipapel y celofán para empacar porciones de sorgo inoculadas con micelio de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.), y con los resultados que se obtengan se establecerá si el empleo de dichas bolsas es favorable.

El empleo de dichas cepa mexicana obedece a que la misma ya ha sido adaptada a condiciones de laboratorio y además se ha observado en ella un vigoroso crecimiento.

5. OBJETIVOS

- 5.1 Encontrar otras alternativas para empacar el grano a utilizar en la producción de inóculos primarios y secundarios de una cepa mexicana *Pleurotus ostreatus*. (Jacq.: Fr.)
- 5.2 Determinar si existe diferencia en cuanto al desarrollo del micelio de *P. ostreatus* sobre sorgo, cuando se utilizan bolsas de polipapel, celofán y frascos de vidrio.

4. HIPOTESIS

Si existe diferencia en cuanto al desarrollo del micelio de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) sobre sorgo, cuando se utilizan bolsas de polipapel y celofán para empacar el grano, en lugar de frascos de vidrio.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO.

Para llevar a cabo el presente estudio, se utilizará el micelio de una cepa mexicana de *F. ostreatus*. (Jacq.: Fr.), el cual será inoculado sobre sorgo (*Sorghum bicolor*).

7.2 Recursos.

7.2.1 Humanos.

El estudio será realizado por el Br. Héctor Rigoberto Arriola Higueros, con la asesoría de la Licda. Karin Larissa Herrera Aguilar del Laboratorio de Macromicetos del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.2 Físicos.

Equipo de Laboratorio:

- Cajas de Petri (100x15 mm.)
- Agar Extracto de Malta
- Asa en espátula
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Frascos de vidrio (180x90 mm.), con tapadera plástica
- Bolsas de polipapel (Capacidad para 1 lb.)
- Bolsas de celofán (Capacidad para 1 lb.)
- Incubadora para hongos
- Balanza analítica
- Papel kraft
- Incinerador para asas
- Cubetas plásticas

Cristalería:

- Probeta de 500 ml.
- Erlenmeyer de 500 ml.
- Beaker de 500 ml.

Materiales de oficina:

- Lapicero
- Cuaderno
- Hojas de papel bond (60 gr.) tamaño carta
- Máquina de escribir (Brother GX-9000)
- Computadora (Epson Action Note 650C)

Equipo vario:

- Cámara fotográfica (Cannon)
- Películas fotográficas ASA 100 para diapositivas a color (Kodak).

7.3 Diseño de la investigación

Se realizó un estudio Cuasi-experimental, el cual consistió en la elaboración de inóculos primarios de una cepa mexicana de *P. ostreatus*. (Jacs.: Fr.), inoculada sobre sorgo empacado dentro de bolsas de polipapel y celofán, con el fin de establecer si éstas pueden ser utilizadas como sistemas alternos para empacar el grano, por lo que se verificó su tolerancia al calor generado durante la esterilización de cada porción, facilidad de manipulación de la semilla, así como el desarrollo del micelio sobre el grano. Estos parámetros también fueron evaluados en los inóculos empacados con frascos ya que los mismos sirvieron de control.

El tamaño de la muestra fue de 35 frascos de vidrio de 180x90 mm. con 250 gr. de sorgo, y 35 bolsas de polipapel y celofán (capacidad para 1 lb.), con igual cantidad de grano.

Los resultados generados durante la evaluación hecha a los sistemas con respecto a su tolerancia al calor, fueron recabados en base al instrumento descrito en la tabla No. 1; utilizando el siguiente criterio: R, cuando el sistema no presentó ningún daño en su estructura, y PR cuando éste si hubo daño.

En cuanto a los resultados sobre el desarrollo del micelio, éstos fueron recabados en la tabla No. 2; utilizando el siguiente criterio: + Cuando el

crecimiento observado fue igual o menor al 25%, ++ Cuando el crecimiento fue igual al 50% y +++ Cuando el crecimiento fue igual o mayor al 75%.

7.4 Procedimiento general.

- * Se cultivó el micelio de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.), sobre agar Extracto de Malta, y posteriormente inoculado sobre sorgo.
- * El grano elegido, fue limpiado y dejado en remojo durante 15-18 horas., transcurrido este tiempo, se procedió a eliminar el exceso de agua, por lo que éste fue escurrido.
- * Seguidamente fueron pesadas porciones de 250 grs. para llenar los diferentes sistemas (frascos y bolsas), los que fueron esterilizados junto con el grano a 121 °C y 15 lbs./plg². de presión durante 30 a 40 minutos.
- * Una vez esterilizado el grano, éste se dejó enfriar y se unoculó asépticamente en campana de flujo laminar, con micelio de la cepa cultivada sobre agar extracto de malta.
- * Después de inocular cada porción de grano, éstas se incubaron a 26 °C y en completa oscuridad durante 21 días, período en el cual se realizaron periódicas observaciones, para establecer si existe diferencia en cuanto al desarrollo del micelio cuando se emplean bolsas en lugar de frascos de vidrio. Con respecto a la tolerancia de la bolsas hacia el calor, la determinación se hizo inmediatamente después de haberlas esterilizado juntamente con el grano.

8. RESULTADOS

Se elaboraron un total de 105 inóculos primarios de una cepa mexicana de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.), cuyo micelio se aisló en agar extracto de malta. Luego éste se sembró en sorgo empacado en tres diferentes sistemas. Frascos de vidrio, Bolsas de polipapel y celofán. Se empacaron 35 porciones de 250 grs. por cada sistema.

Para las finalidades del estudio, éste se dividió en dos fases. Durante la primera, se evaluó el comportamiento de las bolsas y los frascos en cuanto a su resistencia al calor, por lo que cada sistema fue inspeccionado inmediatamente después de haber sido esterilizado con el grano a 121 °C y 15 lbs./plg² de presión durante 30 minutos.

Como resultado de dicha investigación, se observó que las bolsas de polipapel son bastante resistentes al calor, en tanto que las de celofán tienden a deformarse y romperse con mucha facilidad, de tal cuenta que dos porciones empacadas con este sistema tuvieron que ser descartadas, ya que el empaque se rompió del fondo (Tabla No.1)

En cuanto a los frascos de vidrio, en éstos no se observó daño alguno, sin embargo, durante la manipulación posterior, uno de las porciones empacadas con este sistema tuvo que ser descartada, ya que cuando se lleva a cabo la dispersión de la semilla, el frasco se rompió (Tabla No.1).

Tabla No. 1

RESISTENCIA AL CALOR OBSERVADA EN LOS SISTEMAS EMPLEADOS PARA EMPACAR LOS INOCULOS PRIMARIOS DE UNA CEPA MEXICANA DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.)

SISTEMA			
No.	F. de vidrio	B. de polipapel	B. de celofán
1	PR	R	PR
2	R	R	PR
3	R	R	PR
4	R	R	PR
5	R	R	PR
6	R	R	PR
7	R	R	PR
8	R	R	PR
9	R	R	PR
10	R	R	PR
11	R	R	PR
12	R	R	PR
13	R	R	PR
14	R	R	PR
15	R	R	PR
16	R	R	PR
17	R	R	PR
18	R	R	PR
19	R	R	PR
20	R	R	PR
21	R	R	PR
22	R	R	PR
23	R	R	PR
24	R	R	PR
25	R	R	PR
26	R	R	PR
27	R	R	PR
28	R	R	PR
29	R	R	PR
30	R	R	PR
31	R	R	PR
32	R	R	PR
33	R	R	PR
34	R	R	PR
35	R	R	PR

PR = Poco Resistente

R = Resistente

Por último, en las porciones empacadas en celofán, se observó mucha acumulación de agua y no así en las empacadas en polipapel y vidrio, donde ésta fue muy leve.

Siguiendo con la segunda fase, en ésta se evaluó el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en los tres diferentes sistemas, por lo que

cada porción fue inoculada con micelio aislado en agar e incubadas a 26 °C durante 21 días y en completa oscuridad.

Durante los primeros 15 días de incubación, se observó un vigoroso crecimiento del micelio en todas las porciones empacadas en polipapel y frascos vidrio, pero no así en las empacadas en celofán, donde 7 porciones (20%) presentaron escaso crecimiento (Tabla No.2).

Al finalizar el período de incubación establecido, la diferencia observada en las porciones empacadas en celofán, no fue significativa, ya que el 89% de las mismas, presentaron un crecimiento vigoroso, similar al observado en aquellas empacadas en polipapel y frascos de vidrio (Tabla No.2).

Por último, en algunas de las porciones empacadas en celofán se observó crecimiento del micelio sobre la superficie interna del empaque.

Tabla No. 2

DESARROLLO DEL MICELIO DE UNA CEPA MEXICANA DE *Pleurotus ostreatus*
(Jacq.: Fr.), INOCULADA SOBRE SORGO EMPACADO EN TRES DIFERENTES SISTEMAS

SISTEMA						
No.	F. de vidrio		B. de polipapel		B. de celofán	
	15 DIAS	21 DIAS	15 DIAS	21 DIAS	15 DIAS	21 DIAS
1	++	+++	++	+++	+	++
2	++	+++	++	+++	+	++
3	++	+++	++	+++	+	++
4	++	+++	++	+++	+	++
5	++	+++	++	+++	+	+++
6	++	+++	++	+++	+	+++
7	++	+++	++	+++	+	+++
8	++	+++	++	+++	++	+++
9	++	+++	++	+++	++	+++
10	++	+++	++	+++	++	+++
11	++	+++	++	+++	++	+++
12	++	+++	++	+++	++	+++
13	++	+++	++	+++	++	+++
14	++	+++	++	+++	++	+++
15	++	+++	++	+++	++	+++
16	++	+++	++	+++	++	+++
17	++	+++	++	+++	++	+++
18	++	+++	++	+++	++	+++
19	++	+++	++	+++	++	+++
20	++	+++	++	+++	++	+++
21	++	+++	++	+++	++	+++
22	++	+++	++	+++	++	+++
23	++	+++	++	+++	++	+++
24	++	+++	++	+++	++	+++
25	++	+++	++	+++	++	+++
26	++	+++	++	+++	++	+++
27	++	+++	++	+++	++	+++
28	++	+++	++	+++	++	+++
29	++	+++	++	+++	++	+++
30	++	+++	++	+++	++	+++
31	++	+++	++	+++	++	+++
32	++	+++	++	+++	++	+++
33	++	+++	++	+++	++	+++
34	++	+++	++	+++	++	+++
35	++	+++	++	+++	++	+++

+ = Escaso crec. ++ = Regular crec. +++ = Abundante crec.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la primera fase del estudio, indican que las bolsas de celofán y los frascos de vidrio, pueden no ser adecuados para empacar los inóculos primarios y secundarios de *Pleurotus ostreatus*.

En el caso de las bolsas de celofán, éstas son fabricadas con celulosa. Un carbohidrato isómero del almidón, que es el constituyente fundamental de los vegetales. Sin embargo, debido al ordenamiento de sus moléculas durante el proceso de fabricación del celofán, su fuerza tensil se ve disminuida. Por lo tanto, al someter las bolsas a la acción del calor húmedo generado durante el proceso de esterilización, éstas se vuelven sumamente frágiles y deben ser manipuladas con cuidado para evitar que se rompan (31,32).

En cuanto a los frascos de vidrio, aunque en éstos no se haya observado daño alguno, es importante hacer notar, que cuando éstos son retirados del autoclave, el cambio brusco de temperatura que sufren, provoca el desarrollo de tensiones inertes llamadas **de temple**, las que frecuentemente comunican fragilidad y por lo tanto, dichos sistemas también deben ser manipulados con extremo cuidado (33,34).

Algunos autores como Stamets P., recomiendan el empleo de bandas de hule para llevar a cabo la dispersión de la semilla, cuando se emplean frascos de vidrio para empacar ésta, ya que con ello se puede evitar no sólo la pérdida del inóculo sino también serios accidentes de laboratorio (25).

Con respecto a las bolsas de polipapel, éstas pueden llegar a convertirse en un sistema alterno adecuado para empacar el grano utilizado en la producción de inóculos de *Pleurotus*, ya que las mismas son fabricadas con un termoplástico conocido como polietilino de alta densidad (35,36).

Las moléculas del polietilino de alta densidad están acomodadas en una forma tan compacta, por lo que dicho material posee bastante dureza y resistencia, así como una fuerza tensil mucho mayor que la de los termoplásticos de baja densidad (35,36).

En cuanto a los resultados de la segunda fase, el escaso crecimiento del micelio observado en las porciones empacadas en celofán, pudo deberse a ciertos factores, tales como: Poca dispersión de las semillas entre sí, ya que estas porciones tuvieron que ser manipuladas con extremo cuidado debido a lo frágil del empaque.

A este respecto, Guzmán y Sánchez, comentan que cuando hay una pobre dispersión de la semilla, es mucho más difícil que se de la invasión del micelio dentro de ésta (3,11).

Sin embargo, otro factor que también pudo repercutir en el escaso crecimiento del micelio observado en dichas porciones, es el exceso de agua que se dió dentro de éstas, ya que a este respecto, Sánchez, comenta que esto provocará una sobrefermentación del grano, la que conlleva a que se pierda la materia orgánica presente en el mismo (11).

Por aparte, el desarrollo miceliar observado sobre la superficie interna del celofán, ya ha sido reportado en estudios llevados a cabo por Stamets (25). Y esto se debe a que la celulosa constituye una de las principales fuentes de energía para el género *Pleurotus* (23).

El hecho de que en las porciones empacadas en celofán se observara un crecimiento vigoroso del micelio, similar al registrado en los frascos de vidrio, pudo deberse a que en ambos sistemas no hubo excesiva acumulación de agua y además la dispersión de la semilla se llevo a cabo con mucha mayor facilidad.

RECEIVED
1968

SACA

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Las bolsas de polipapel pueden ser utilizadas como sistema alternativo para empacar la semilla a utilizar en la producción de inóculos primarios y secundarios de *Pleurotus ostreatus*.
- 10.2 Las bolsas de celofán deben ser manipuladas con extremo cuidado, ya que éstas se vuelven sumamente frágiles después de ser esterilizadas.
- 10.3 Los frascos de vidrio son inadecuados para empacar la semilla a utilizar en la producción de inóculos de *Pleurotus ostreatus*, ya que éstos se templan al ser retirados del autoclave y se rompen con mucha facilidad.
- 10.4 El empleo de bolsas de polipapel y celofán como sistema alternativo para empacar los inóculos de *Pleurotus ostreatus*, no interfiere en el desarrollo del micelio de éste sobre el grano, ya que el mismo fue similar al observado en los inóculos empacado en frascos de vidrio..
- 10.5 Dado que las bolsas de celofán son fabricadas con celulosa, pueden ser consuminadas eventualmente por el micelio del hongo, ya que éste utiliza como fuente de energía materiales ligno-celulósicos.
- 10.6 Debido a la flexibilidad y resistencia de las bolsas de polipapel, la semilla puede ser desbaratada con mayor facilidad, que cuando se emplean frascos de vidrio y bolsas de celofán para empacar los inóculos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar realizando estudios sobre la utilización de otros sistemas distintos a los frascos de vidrio, para el empaque de los inóculos primarios y secundarios de *Pleurotus ostreatus*, tomando en cuenta que éstos deben ser altamente resistentes al calor, que no interfieran con el desarrollo del micelio, biodegradables y que su precio sea bajo.
- 11.2 Estandarizar todos los parámetros que de una u otra forma puedan afectar el desarrollo del micelio sobre el grano empacado en los sistemas a estudiar, principalmente en lo que se refiere a: Utilización de cepas vigorosas, pH de los medios de cultivo así como del grano, porcentaje de humedad, tanto del ambiente como del sustrato, concentración de CO_2 y O_2

12. REFERENCIAS

- 12.1 Whitakker R., New concepts of Kingdoms of Organisms. Science, 1969.
- 12.2 Ulloa M., Herrera T., El Reino de los Hongos.: Microbiología Básica y Aplicada. México: Fondo de Cultura Económica (UNAM), 1990.
- 12.3 Guzmán G., et. al. El cultivo de los Hongos Comestibles. 1a.ed. México: Instituto Politécnico Nacional, 1993.
- 12.4 Arora D. Mushrooms Demystified. 2a. ed. Berkley: Tenspeed Press, 1988.
- 12.5 Noris U., Setas: Descripción, Localización, Toxicidad o Valor culinario. Dicoiki Trad. México: Daimon, 1982.
- 12.6 Mendoza R., Montoya G., Las Setas.: Manual Práctico para el aficionado. Bilbao: Iberduero, 1981.
- 12.7 Alexopoulos J., Introductory Mycology. 3a. ed. New York: Willey, 1980.
- 12.8 Deacon J., Introducción a la Micología Moderna. México: Limusa, 1988.
- 12.9 Raynes R., Mushrooms & Toadstools.: The handling publishing. England: Group Limited, 1979.
- 12.10 Guzmán G., Identificación de los Hongos Comestibles, Venenosos y Alucinógenos. México: Limusa, 1979.
- 12.11 Sánchez J., Producción de Hongos Comestibles. Tapachula, Chiapas (México): Centro de Investigaciones del Sur-este., 1993.
- 12.12 Jandaik C., Karoor J., Amino Acid Composition of Mushroom *Pleurotus sajor-caju*. (Fr.) Singer. J. Mushrooms, 1978.
- 12.13 Manu-Tawiah W., Martin A., Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. Food Microbiology. 1987, 4, 303-310.
- 12.14 Mukta S., Verna R., Nutritional and Toxicological Evaluation of *Pleurotus spp*. J. Food Sci. Technol, 1991, Vol. 28, No. 4. (259-260p).
- 12.15 Trigos A., Martínez-Carrera D., Identificación de Ergosterol en *Pleurotus ostreatus*. Micol. Neotrop. Apl. 5:11-15, 1992.
- 12.16 Lelley J., The Economic importance of Macromicetes: The actual situation and future prospect. J. Mushrooms. 1982, Mar.: 77-79. Apl.: 133-141.
- 12.17 Chang ST., Mushrooms Biology: The Impact on Mushroom production and Mushroom products. Hong-Kong: The Chinese University Press, 1983.
- 12.18 Chang ST. Hayes W., The biology and cultivation of edible mushrooms. New York: Academic 1978.

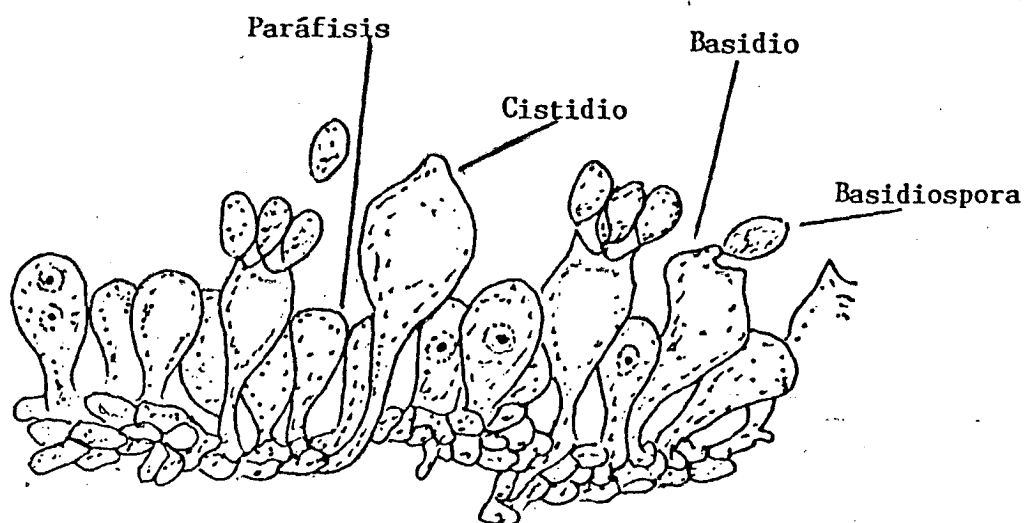
- 12.19 Chang ST., Quimio T., Tropical Mushrooms: Biological Nature and cultivation methods. Hong-Kong: The Chinese University Press, 1982.
- 12.20 Chang ST., Miles P., Edible Mushrooms and their cultivation. Boca Ratón: CRC 1989.
- 12.21 Gray W., The use of fungi as food and in food processing (2 vols.) Cleveland: Chemical Rubber Co. Press 1970.
- 12.22 García M., Cultivo de Setas y Trufas. Castello (Madrid): Mundi-Prensa., 1987.
- 12.23 Martínez A., et. al. Progress in Biopulping of non-woody materials: Chemical, Enzymatic and Ultrastructural aspects of wheat straw delignification with Ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Federation of European Microbiological Societies: Elsevier, 1994.
- 12.24 Stamets P., Chilton J., The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home. Washington: Agarikon Press, 1990.
- 12.25 Stamets P., Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms: A comparison Guide to the Mushroom Cultivator. Hong-Kong: Tenspeed Press, 1993.
- 12.26 Bisko N., Bilay V., Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre materiales lignocelulósicos. Micol. Neotrop. Apl. 5: 49-57, 1992.
- 12.27 Hurle J., Land E., Prescott O., Sorghum and the Millet Composition and Nutritional Value. London: Academic, 1980.
- 12.28 Martin J., History and Clasificación of Sorghum (*Sorghum bicolor*) (Linn.) Moench. Connecticut: The Avi, 1970.
- 12.29 Cardona H., Formación de Híbridos de Sorgo. Guatemala: ICTA. Doc. Tec. No. 17, 1982.
- 12.30 Ozaeta M., Evaluación de tres variables de Sorgo. (*Sorghum bicolor*) (L) Moench. Guatemala, Guatex rojo, Guatex blanco, en el departamento de Jutiapa, Guatemala: USAC (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía), 1977.
- 12.31 Hawley G., Diccionario de Química y Productos Químicos. Barcelona (España): Ediciones Omega, 1975.
- 12.32 Mc Graw-Hill Encyclopedia of Science and Technology. United States: Mc Graw-Hill Co. 1960, Vol 2, (662p).
- 12.33 Calvet E., Química General Aplicada a la Industria con Prácticas de Laboratorio. 1a. ed. Barcelona (España): Salvat Editores 1936.

- 12.34 Mc Graw-Hill Encyclopedia of Science and Technology. United States: Mc Graw-Hill Co. 1960, Vol. 6 (207p).
- 12.35 Noller, Carl., Química de los Compuestos Orgánicos. 3a. ed. Argentina: Ateneo Editorial 1976.
- 12.36 Graham T., Química Orgánica. México: Limusa 1985.

UNIVERSIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE
Biblioteca Central

13. ANEXOS

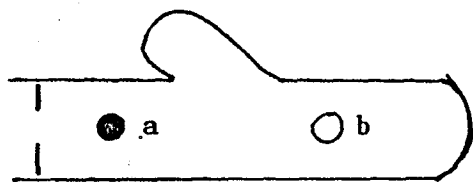
ANEXO 1.



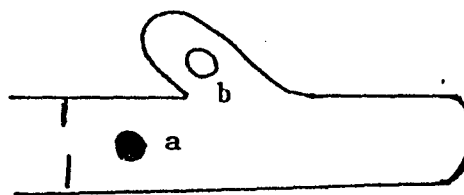
ESTRUCTURA MICROSCOPICA DE LOS BASIDIOMICETOS.

(7-9)

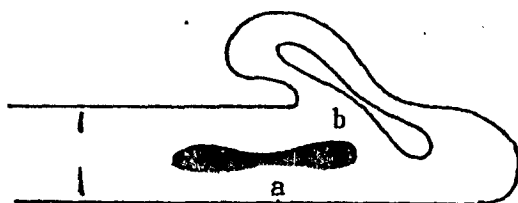
ANEXO 2.



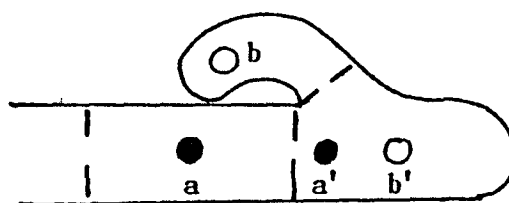
Extremo hifal dicarionte.



Acercamiento del núcleo posterior a a la protuberancia.



División mitótica de los núcleos.



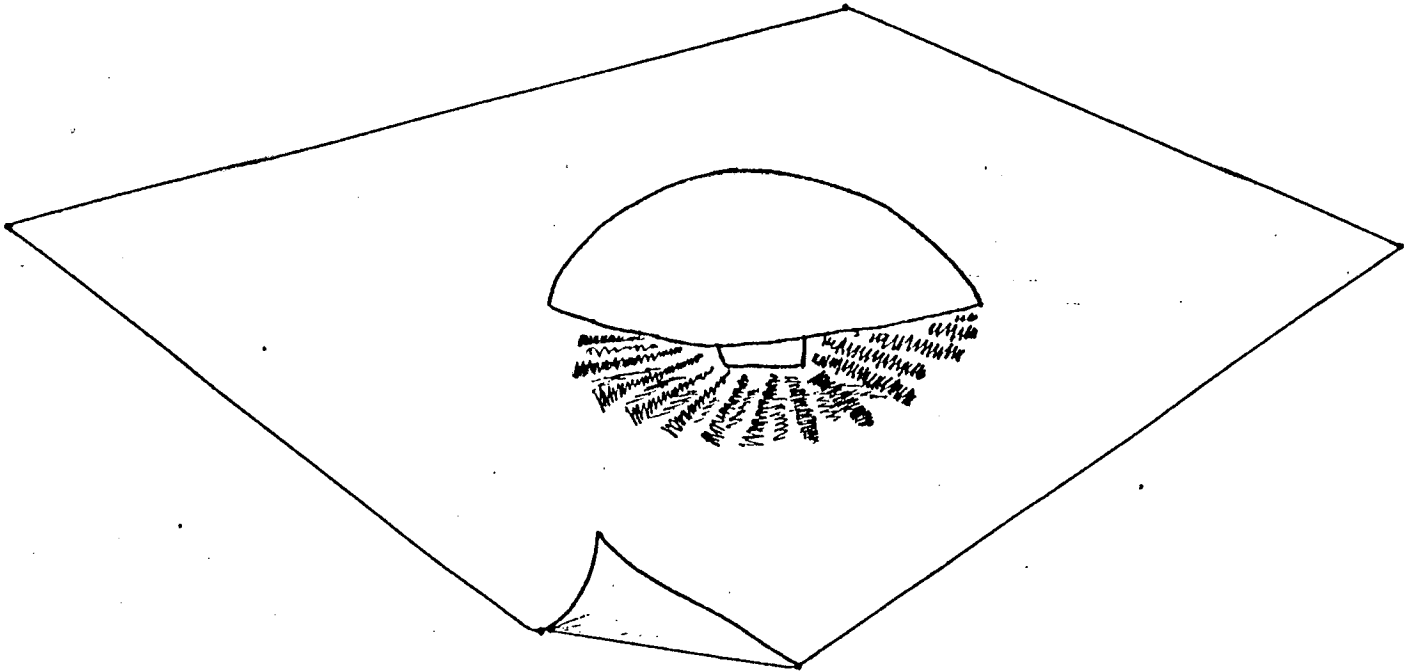
Formación de dos septos, uno delimita la protuberancia, el otro se forma en la hifa principal, precisamente por debajo de la protuberancia.



La pared se disuelve, el micelio se despegaza.

DESARROLLO DE LAS FIBULAS (7,8)

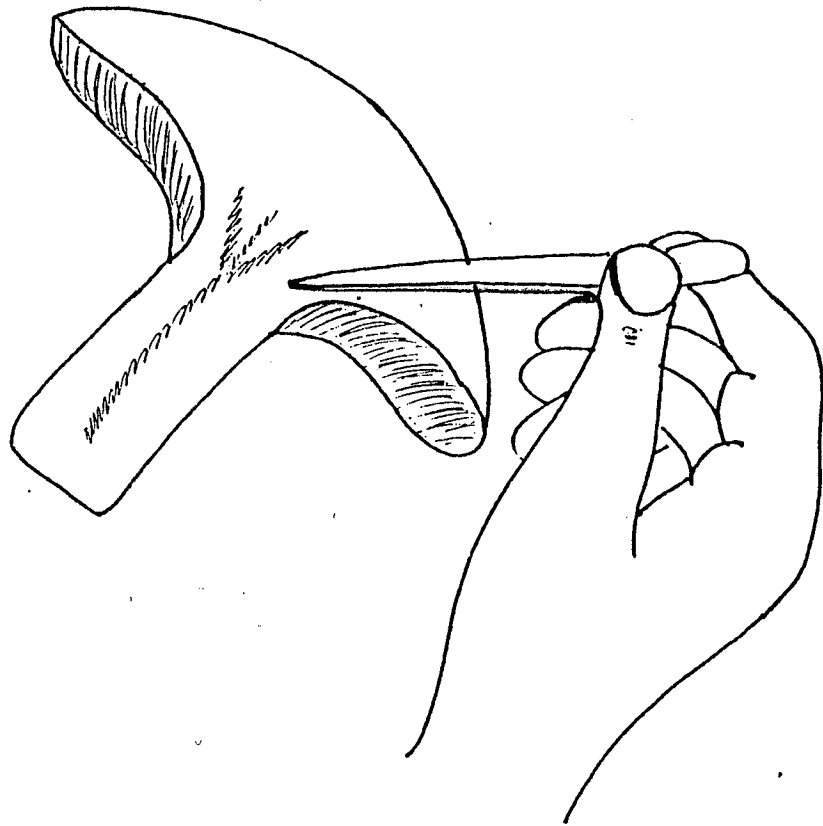
ANEXO 3.



ESFORADA O "AISLAMIENTO ESPORICO" SOBRE PAPEL.

(11, 25)

ANEXO 4.



OBTENCIÓN DEL MICELIO, UTILIZANDO UNA PORCIÓN
DEL CUERPO DEL HONGO (22).

ANEXO 5.

Sorgo (*Sorghum bicolor*)

-Clasificación botánica:

Tipo: Fanerógama

Subtipo: Angiosperma

Clase: Monocotiledonea

Orden: Glumifora

Familia: Graminacea

Subfamilia: Panicoidea

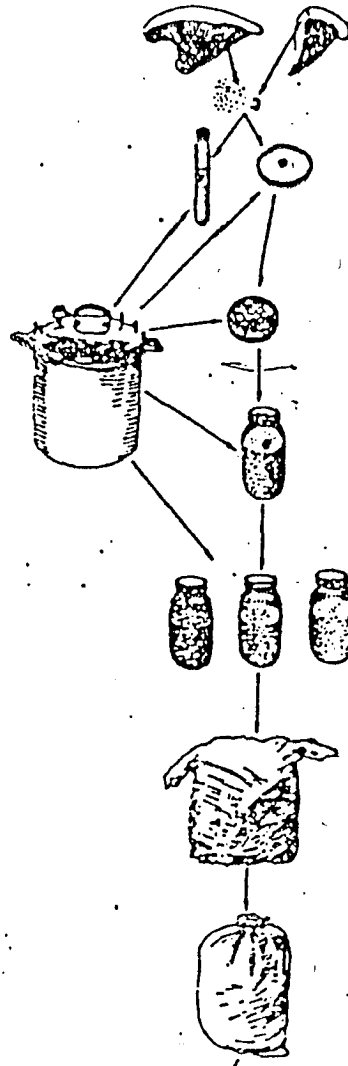
Género: Sorghum

Especie: bicolor (27-30).

Descripción de la planta.

La longitud del tallo varía de acuerdo a la variedad, desde uno a 45 cms. hasta más de 4 mts., su grano puede variar de 5 a 7 mm. de diámetro. Las hojas son envainadoras, pueden variar en número de 7 hasta 24; son de forma linear, lanceolada y paralelinervada, el sistema radicular es bien desarrollado, originandose a partir de nudos subterráneos del tallo. Las raíces son generalmente más finas y fibrosas que las del maíz (27-30).

ANEXO 6.



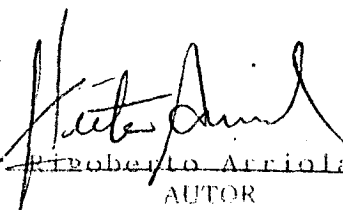
Obtención del micelio.

Producción de inóculos primarios y secundarios.

Inoculación del sustrato definitivo, para la obtención de los cuerpos fructíferos.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CULTIVO DE Pleurotus ostreatus
(3, 11, 25).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD
Biblioteca Central



Héctor ~~Roberto~~ Arriola Higueros

AUTOR

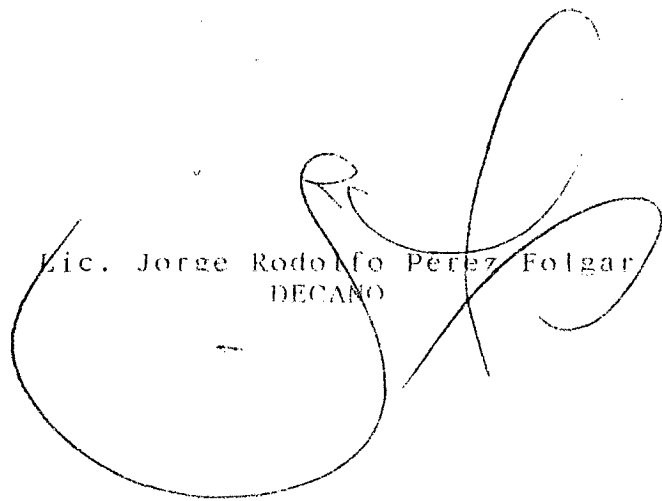


Licda. Karin Larissa Herrera Aguilar

ASESORA



Lic. Gerardo Arroyo
DIRECTOR



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

DECANO