

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

**Guía para el Establecimiento y Control de Buenas Prácticas
para la producción de inóculo de hongos comestibles
(*Pleurotus ssp*)**

NANCY BEATRIZ CALDERON MÜLLER

**MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD CON ESPECIALIDAD EN
INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

Guatemala, febrero de 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Guía para el Establecimiento y Control de Buenas Prácticas
para la producción de inóculo de hongos comestibles
(*Pleurotus ssp*)**

**Trabajo de Graduación
Presentado por**

NANCY BEATRIZ CALDERON MÜLLER

Para optar al grado de

**MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD CON ESPECIALIDAD EN
INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

Guatemala, febrero de 2010

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

ÒSCAR MANUEL CÒBAR PINTO, Ph.D	DECANO
LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO, M.A	SECRETARIO
LICDA LILIAN RAQUEL IRVING ANTILLON	VOCAL I
LICDA LILIANA VIDES DE URIZAR	VOCAL II
LIC. LUIS ANTONIO GALVEZ SANCHINELLI	VOCAL III
BR. BERTA ALEJANDRA MORALES MERIDA	VOCAL V

**CONSEJO ACADEMICO
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

OSCAR MANUEL COBAR PINTO, Ph. D.

LICDA ANNE MARIE LIERE DE GODOY, Msc.

DR. JORGE LUIS DE LEON ARANA

DR. JORGE ERWIN LOPEZ GUTIERREZ

LIC. FELIX RICARDO VÈLIZ FUENTES, Mcs.

Licda. Nancy Calderón Müller
Autor

Ing. Álvaro Díaz
Asesor

Licda. Carmen Rosa Godoy, Msc.
Revisor

Licda. Anne Marie Liere de Godoy, Msc.
Directora Escuela de Estudios de Postgrado

Dr. Óscar Manuel Cobar Pinto Ph.D.
Decano Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

INDICE GENERAL

	Página
I. Resumen Ejecutivo	8
II. Introducción	9
III. Definición del problema	10
IV. Justificación	11
V. Marco Teórico	12
VI. Objetivos	28
VII. Guía para el Establecimiento y Control de Buenas Prácticas para la producción de inóculo de hongos comestibles (<i>Pleurotus ssp</i>)	29
VIII. Métodos y técnicas empleadas	61
IX. Conclusiones	62
X. Recomendación	63
XI. Bibliografía	64

INDICE
GUÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO Y CONTROL DE
BUENAS PRÁCTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE
HONGOS COMESTIBLES (*Pleurotus ssp*)

Condiciones de las instalaciones del laboratorio de Hongos Comestibles:

	Pag
1 Condición física del área de laboratorio.....	30
1.1 Diseño y Construcción.....	30
1.2 Instalaciones sanitarias.....	36
1.3 Servicios sanitarios, vestidores y duchas.....	36
2 Salud e Higiene del personal.....	38
2.1 Personal.....	38
2.2 Capacitación.....	38
2.3 Practicas Higiénicas.....	39
2.4 Control de la salud del personal.....	40
2.5 Medidas de control al personal	40
2.6 Monitoreo al personal.....	41
3 Alrededores del laboratorio.....	41
3.1 Alrededores.....	41
3.2 Ubicación.....	42
4 Limpieza y desinfección.....	42
4.1 Limpieza y desinfección de áreas.....	42
4.2 Elaboración de desinfectantes para áreas.....	43
4.3 Limpieza y material de laboratorio.....	44
4.4 Descontaminación de espacios y superficies.....	44
4.5 Esterilización de material de laboratorio en el autoclave.....	45

4.6	Aspectos importantes del programa de limpieza y desinfección.....	45
4.7	Medidas de control al programa de desinfección y limpieza.....	46
4.8	Monitoreo al programa de desinfección y limpieza.....	46
	5 Manejo, disposición, descontaminación de desechos y áreas.	47
5.1	Manipulación de desechos.....	47
5.2	Germicidas Químicos.....	48
5.3	Desechos Sólidos y basura.....	48
5.4	Control de plagas en el laboratorio.....	49
	6 Equipo y material necesario para el laboratorio.....	50
6.1	Equipo y material necesario para el laboratorio.....	50
6.2	Material y equipo necesario para el laboratorio.....	51
6.3	Programa de mantenimiento	51
	7 Control en el proceso y en la producción del inculo.....	52
7.1	Técnicas de obtención.....	52
7.2	Semilla Primaria.....	52
7.3	Semilla Secundaria.....	53
7.4	Materias primas y reactivos.....	53
7.5	Sistema de producción de inculo	53
7.6	Empacado.....	54
	8 Control de calidad en el laboratorio.....	54
8.1	Parámetros de calidad del inculo	54
8.2	Tasa de crecimiento radial.....	55
8.3	Tasa de incubación.....	56
8.4	Pruebas de validación del cultivos	56
8.5	Información que debe llevar el inculo a la hora de comercializarlo.....	56
	9 Glosario.....	57

I. RESUMEN EJECUTIVO

Con la finalidad de hacer un sistema integrado de calidad aplicable al laboratorio productor de inóculo en esta guía se toman aspectos de bioseguridad en el laboratorio así como aspectos de buenas prácticas de laboratorio.

Como resultado la guía aborda aspectos de infraestructura, manejo de desechos, descontaminación, programas de limpieza y desinfección, control de plagas, mantenimiento de equipo y material de laboratorio, capacitación del personal, control en el proceso y en la producción de inóculo, empaçado, y el control de calidad de inóculo tomando en cuenta parámetros importantes a considerar para el cumplimiento de las buenas prácticas que aseguran la calidad del inóculo que va a satisfacer las necesidades de los productores de hongos.

La guía tiene como objetivo ser una herramienta para la implementación y control de las buenas prácticas en el laboratorio para la producción de semilla de hongo comestibles (*Pleurotus ssp*).

Además pretende ser el primer paso a tomar para involucrar al sistema de producción de inóculo un sistema integrado de calidad necesario para la calidad de la semilla, los costos y mantener una mejora continua y así lograr posesionarse del mercado nacional e incursionar en mercados internacionales.

Esta será la garantía de calidad que el agricultor necesita para comprobar la procedencia de su materia prima y poder garantizar la trazabilidad de las setas obtenidas.

II. INTRODUCCION

El cultivo de hongos comestibles es una actividad, que se ha convertido en una alternativa productiva interesante, ya que el emprendimiento para la producción no representa elevados costos. Entre las ventajas gastronómicas que presentan los hongos comestibles es que representan productos con un alto contenido proteico aun mayor del que presentan los vegetales además de contener aminoácidos esenciales importantes para una dieta balanceada. Otra ventaja de producir Hongos Comestibles es que para establecer el cultivo se utilizan desechos de las actividades productivas agropecuarias, generalmente de fácil obtención.

Esta guía pretende tomar aspectos importante para integrar al laboratorio productor de inóculo a un sistema de calidad que asegure al productor y garantice la buena procedencia de la semilla, confiable que aseguren la trazabilidad del hongo a obtener y que pueda ser bien cotizado en el mercado tanto nacional como internacional.

Sin embargo en Guatemala hay un vacío en la implementación de normas de calidad por lo que la guía da lineamientos indispensables para el aseguramiento de la misma y establece una mejora continua.

III. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En Guatemala el cultivo de hongos comestibles ha tomado mucho auge, debido a que resulta ser un cultivo que se puede establecer fácilmente y a un bajo costo. El problema al que se enfrenta a la hora del establecimiento de este cultivo, es debido a que hay pocos laboratorios productores de semilla, y muchos de ellos aun no tiene un sistema de calidad incorporado que les garantice en la fase de producción de inóculo o semilla, baja incidencia de contaminantes, altos rendimientos, bajos costo, y por lo consiguiente, calidad a la hora de obtener los cuerpos fructíferos.

El proceso de producción de inóculo es una etapa importante, ya que determinará en una etapa posterior la calidad del cuerpo fructífero. Esto crea la necesidad de usar normativas que hagan que la cadena productiva sea eficiente y eficaz en la producción, como parte de un sistema de calidad.

IV. JUSTIFICACION

En el proceso de producción de semilla o inóculo se ve la necesidad de incorporar un sistema de calidad, que ayude a obtener una baja incidencia en la contaminación, altos rendimientos, bajos costos, y producción continua de setas. Al combinar aspectos de BP (Buenas prácticas), al proceso de producción se estará tomando aspectos básicos que garanticen al consumidor productos cultivados de materias primas de calidad, que sean capaces de competir a nivel nacional e internacional.

Es importante tomar en cuenta que este cultivo representa una alternativa en Guatemala, sobre todo para las áreas rurales, ya que su establecimiento no representa inversiones muy altas, y es un cultivo que puede fácilmente establecerse. Debido a que ya existe una alta demanda para la obtención de semilla, es importante asegurar la calidad de esta materia prima para que al la hora de establecer el cultivo se obtengan setas con los mejores estándares de calidad.

Al ofrecer semilla o inóculo de calidad se pueden desarrollar programas de extensión de este cultivo para ofrecer a las áreas rurales del país una oportunidad de producir su propio alimento con una naturaleza proteica más alta que los vegetales, y también una oportunidad para incursionar en diferentes mercados. Estos programas también podrían ayudar a reducir la contaminación ambiental ya que se pueden utilizar residuos del sector agropecuario y con esto reducir costos de producción de la seta.

V. MARCO TEORICO

GUÍA PARA LA PRODUCCIÓN DEL HONGO COMESTIBLE (*Pleurotus ssp*)

- a. **Características distintivas de los hongos:** se encuentran ampliamente distribuidos en todo el planeta y prosperan en casi todos los climas: tropicales, subtropicales, templados, fríos, en todos aquellos ámbitos de temperaturas comprendidas entre 4 a 60 grados centígrados, donde se encuentren los elementos indispensables para su existencia como material orgánico y agua. Se calcula que solamente un 5 por ciento de los hongos existentes en el mundo son conocidos científicamente. Se ha estudiado un número pequeño de hongos de los cientos de miles de especies existentes. De ellos solamente unas decenas de especies son usadas con fines gastronómicos o medicinales. El conocimiento de los hongos es milenario y su estudio sistematizado tuvo comienzo en los últimos años y está todavía por desarrollar, solamente hay un par de decenas de especies que sean comercializadas en el mundo (Pineda, 1998).

Los hongos son organismos eucariotes, con pared celular rara vez ausente y constituida principalmente de quitina. Su micelio está formado por estructuras ramificadas y filamentosas cuyos fructificaciones portan esporas. No poseen pigmentos clorofílicos y por lo tanto su nutrición es heterótrofa. Presentan reproducción sexual y asexual (Tormo, 1996).

La micología es la ciencia que estudia los hongos y el término hongo se deriva del latín "fungus" que significa seta y del griego "sphongos" que significa esponja. Se ha demostrado que los hongos son el grupo de organismos más numeroso en la Tierra después de los insectos. En efecto, se calcula que hay más de 1, 500,000 especies de hongos, por lo que su impacto en el medio es enorme. La diversidad de estos organismos, favorece que se desarrollen en un sin fin de hábitats, por lo que bien se dice que los hongos están en todas partes (Guzmán, 1997).

- b. **Caracterización del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kummer):** Los hongos del género *Pleurotus* son saprofiticos,

descomponedores de madera. Estos hongos se alimentan de la materia orgánica en la que están creciendo, degradando las sustancias con enzimas que liberan al medio húmedo que les rodea, por ello la importancia de suministrar un substrato adecuado cuando se le intente cultivar. La diversidad del género *Pleurotus* abarca al menos 30 especies, entre ellas, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. smithii*, *P. levis*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-cajou*, *P. citrinopileatus* y *P. ostreatus* (Belt, 1998).

El cultivo de *Pleurotus ostreatus* ha tenido un desarrollo rápido y amplia aceptación en el mercado por sus propiedades nutricionales, sabor, consistencia, la variedad de residuos orgánicos en los que es capaz de crecer y adaptación a un amplio intervalo de temperatura. Comúnmente *Pleurotus ostreatus* es conocido como Hongo ostra, aunque también suele llamarsele: Champiñón ostra, Gírgola, Orellana, Seta de chopo o simplemente Seta. *Pleurotus* viene del griego “pleuro” que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al pileo; *ostreatus* en latín quiere decir en forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero. Para su desarrollo, el hongo ostra requiere de condiciones ambientales como temperatura, humedad, oxígeno y cierta cantidad de luz. Todos estos factores tienen que satisfacer las necesidades de este hongo y el conocimiento de los mismos permitirá manipularlo y producirlo en condiciones artificiales.

- c. **Características morfológicas del hongo ostra:** Los carpóforos de *Pleurotus ostreatus*, no presentan anillo ni volva. El pileo es de 5-25 centímetros de diámetro, ampliamente convexo y algunas veces casi plano en la madurez; de margen lobulado a ondulado, cuando joven; la superficie es lisa, presenta color variable según la intensidad de la luz, con tonos entre blanquecinos, grises o azulados; la carnosidad es blanca y con olor a anís. Lamela formada por agallas decurrentes de color blanco, amarillentas en estado avanzado de desarrollo, no pubescentes. El estípite es corto y grueso, de 0.5 a 3.0 centímetros de longitud, 0.5 a 2.0 centímetros de espesor, excéntrico o lateral con

pubescencia densa de color blanco en la base.

En estado natural crece sobre troncos y ramas de latifoliadas, bien en árboles en pie o más frecuentemente en tocones, árboles derribados o sobre rastrojos de algodón. En zonas de producción de cereales emerge de los montones de pacas de paja cuando las condiciones ambientales son favorables. Fructifica en grupos o racimos en forma de repisas de considerable tamaño. La mayoría de recolectores de hongos prefieren los especímenes grandes de carnosidad gruesa (Wood, 1996). Los carpóforos típicos de *Pleurotus ostreatus* se observan en la figura 7.



Figura 7. Setas de *Pleurotus ostreatus* ECS-112 sobre pulpa de café

- d. **Composición nutricional:** *Pleurotus ostreatus* se caracteriza por sus propiedades organolépticas, reflejada en su aspecto, aroma agradable, utilización para la elaboración de numerosos platillos. El hongo ostra presenta variaciones significativas en cuanto a su composición química proximal. Dichas variaciones se ven afectadas por el sustrato, el método de cultivo, así como el origen geográfico de la cepa (Rodríguez et al., 2005). Los minerales se concentran fuertemente en los cuerpos fructíferos. Por ejemplo, el potasio 3.2 veces, el sodio 1.64, el fósforo 1.7 y el cadmio 2.75, en comparación con la concentración de estos minerales en el sustrato (Kawai et al., 1994). Así mismo, el contenido

de proteína de *P. ostreatus* se relaciona significativamente con el contenido de nitrógeno del sustrato. La figura 8 ilustra las variaciones en el contenido de proteína cruda (base seca) en los cuerpos fructíferos, según el sustrato utilizado para el cultivo.

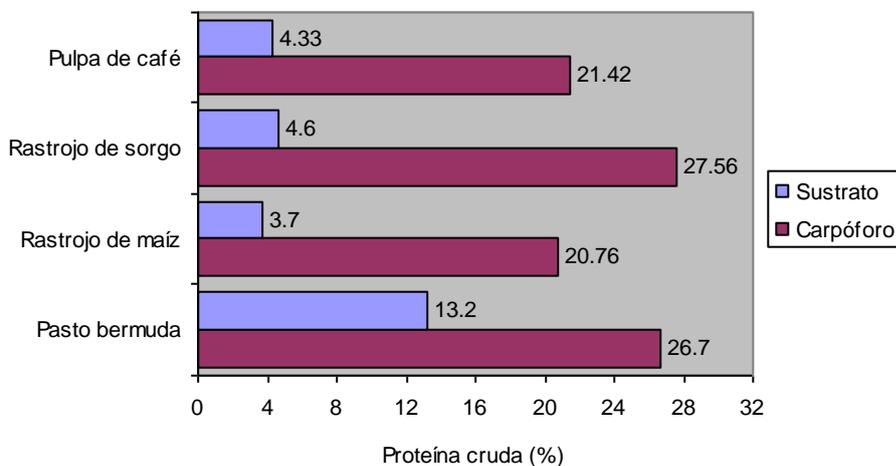


Figura 8. Porcentaje de proteína de los sustratos y los carpóforos de *Pleurotus ostreatus* IBUG-8 (Rodríguez *et al.*, 2005)

Crisan & Sands (1978), citados por Miles & Shu-Tig (1997), realizaron a partir de varias fuentes bibliográficas, un perfil de aminoácidos a una serie de hongos entre los que se encuentra *P. ostreatus*; estos autores concluyeron que las setas contienen todos los aminoácidos esenciales que comprenden del 25 al 40 por ciento del total. Las setas de este hongo contienen lisina, leucina, valina y triptófano, con 72.09, 71.57, 51.28 y 19.61 miligramos por gramo de proteína cruda ($N \times 4.38$), respectivamente. La corrección de la proteína: $N \times 4.38$, en lugar de $N \times 6.25$, es consecuencia del nitrógeno no proteico contenido en la pared celular de los hongos (Miles & Shu-Ting 1997), el cual es digerido y detectado en el método de determinación del contenido de nitrógeno proteico por el método Kjeldahl.

El contenido de vitaminas como tiamina (B_1), riboflavina (B_2), ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido pantoténico; ácido fólico, tocoferol, pirodoxina, cobalamina; provitaminas como la ergosterina, carotenos; de minerales (Calcio, fósforo, potasio, hierro) y su bajo contenido en grasas y carbohidratos, lo hacen valioso en la alimentación y contra padecimientos cardiovasculares e hipertensión (UM, 1998).

e. **Fermentación en estado sólido:** El método comúnmente utilizado para obtener carpóforos de hongos comestibles es la fermentación sólida o fermentación en estado sólido; la cual consiste en hacer crecer el micelio secundario del hongo sobre un sustrato hasta llegar a la fructificación, en ausencia de agua libre en el sistema. El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad metabólica del microorganismo, pero sin exceder la capacidad de retención de humedad del sólido. Para que ello ocurra, el agua debe encontrarse adsorbida en la superficie de las partículas o atrapada dentro de la región capilar del sólido (Dustet, 2004). Este proceso constituye una vía alternativa para el empleo y tratamiento de una amplia gama de subproductos lignocelulósicos de bajo costo, pues no se originan cantidades importantes de desechos líquidos. Por otra parte, la fermentación en estado sólido mejora la composición nutricional y las propiedades físicas de los residuales orgánicos, que bien pueden ser utilizados como fuente de alimento animal o aprovecharse como acondicionador de suelos. La fructificación de los hongos mediante procesos de fermentación sólida se ve afectada por varios factores químicos y físicos del sustrato sobre el cual crecen y por las condiciones ambientales. Entre los factores asociados al sustrato están: El pH, la relación carbono-nitrógeno, el tamaño de partícula, la capacidad de retención de humedad, y la cantidad de carbohidratos, lípidos, nitrógeno, vitaminas y minerales presentes en su composición. Como factores ambientales pueden mencionarse: La temperatura, la humedad relativa, la aireación y bióxido de carbono, la iluminación, etc. El balance de materia para el crecimiento de los hongos, puede ser delineado de la manera que se presenta en la figura 9.

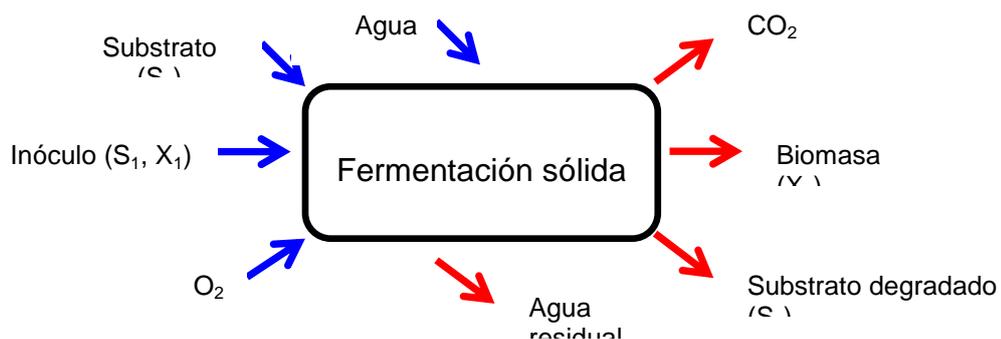


Figura 9. Balance de materia durante el cultivo de un hongo (Sánchez y Royse, 2002)

Para el cual $X_2 = X_1 + Y(S_1) + Y(S_2)$, en donde:

S_1 = Substrato en el inóculo (g)

S_2 = Substrato para fructificación (g)

S_3 = Substrato degradado (g)

X_1 = Biomasa del inóculo (g)

X_2 = Biomasa producida (g)

Y = Rendimiento

En el modelo anterior, X_2 es el total de hongo producido como micelio (X_m) más los cuerpos fructíferos (X_3). Como S_1 no es significativo comparado con S_2 y que X_1 tampoco lo es respecto con X_2 , el rendimiento del proceso puede considerarse como: $Y = \frac{X_2}{S_2}$. Sin

embargo, para este caso especial de producción de carpóforos es más interesante estimar: $Y = \frac{X_3}{S_2}$ que es la fórmula que se utiliza para calcular

el rendimiento de un sistema de cultivo de hongos comestibles. Por consiguiente, resulta de interés práctico para cuantificar el rendimiento, la definición de los términos: Eficiencia biológica (EB) y Tasa de producción (TP) (Royse, 1985), así:

$$EB = \frac{\text{Peso de los cuerpos fructíferos frescos}}{\text{Peso seco del substrato}} \times 100$$

$$TP = \frac{EB}{\text{Tiempo en días (desde la inoculación a la cosecha)}}$$

- f. **Aislamiento y técnicas de conservación de cepas:** La obtención de un cultivo axénico (cultivo puro) consiste en aislar un solo microorganismo (cepa) en condiciones de laboratorio, a través del cultivo de tejidos para producir un clon de descendientes. El cultivo de tejidos es una técnica para aislamiento de cepas y por ello, también una forma de conservación del recurso fúngico. La conservación se refiere al mantenimiento en condiciones óptimas los materiales genéticos

provenientes de clones silvestres, híbridos, cepas comerciales, o cualquier otro material valioso. Requiere de una metodología confiable, sencilla y lo más barata posible que asegure, no solo la conservación de las características genéticas de las cepas, sino también su vitalidad. Por esta situación, la técnica de aislamiento y conservación empleada debe estar establecida de manera perfectamente clara y definida para el laboratorio, para que no haya dudas ni errores, aún cuando cambie el personal que se encarga del aislamiento y la conservación.

g. **Procedimiento y aspectos a tomar en cuenta para obtener un inóculo en el laboratorio:** Para obtener tejido cultivado o un clon del hongo en el laboratorio (Clon se define como un duplicado idéntico en características genéticas de un organismo) se debe seguir los siguientes pasos:

- **Preparar el medio de cultivo:** en el cual se quiere que desarrolle el micelio de la cepa, se vierten 10 ml del medio líquido (45°C) en cada tubo de ensayo de 20x180 mm (22-25% del volumen) y colocan los tapones de algodón (figura 21). Posteriormente se acomodan en grupos en gradilla termo-resistente utilizando papel aluminio y cinta adhesiva (para proteger los tapones de algodón de la humedad) y esterilizar con autoclave durante 15 minutos a 121 grados centígrados y 15 libras por pulgada cuadrada de presión (psi), como se muestra en la figura 22. Ya esterilizados los tubos, se colocan inclinados dentro de la cámara de flujo laminar donde permanecerán durante 3 días, para que el medio se solidifique, chequear la eficacia de la esterilización y desaparezca el agua condensada en la superficie interna de los tubos o caja de Petri (Wilkinson, V.;Royse, D. 2002).



Figura 21. Medio de cultivo preparado y tubos de ensayo llenos colocados en gradilla de plástico termoresistente.



Figura 22. Tubos de ensayo con medio de cultivo y tapones cubiertos con papel aluminio para esterilización en autoclave

- **Esterilización de material e instrumentos:** Los Bisturís, asas, y otros enseres a utilizar para realizar el cultivo de tejido deben esterilizarse de la misma manera que el medio de cultivo para eliminar esporas, bacterias y otros agentes contaminantes (Duque, 1999).
- **Preparación de material en la campana de flujo laminar:** En la cámara de transferencia o campana de flujo laminar, se coloca lo siguiente: Tubos de ensayo con el medio sólido, bisturí, asa, papel aluminio, mechero y fósforos. Se enciende la luz ultravioleta dentro de la cámara durante un hora para irradiar todos los materiales (excepto el carpóforo).
- **Elección del cuerpo fructífero:** Se escoge un cuerpo fructífero limpio, fresco, libre de contaminantes visibles y de la más alta calidad en cuanto a tamaño, color, forma o cualquier otra característica deseada (figura 23). Se esteriliza la superficie del pileo seleccionado, asperjando ligeramente sobre él una solución al 10% de hipoclorito de sodio o alcohol al 70% con un atomizador manual.



Figura 23. Especímenes para realizar el cultivo de tejidos, de izquierda a derecha: Crimini, hongo ostra, champiñón blanco.

- **Transferencia en la cámara de flujo laminar:** Previo a trabajar en la cámara se apaga la luz ultravioleta para no dañar la vista y se procede a trabajar al interior de la cámara. Después de flamear tanto el tubo de ensayo como el bisturí (figura 24), se corta longitudinalmente el pileo, paralelo al estípite para exponer el tejido interno del hongo, cuidando no tocarlo con las manos (figura 25). Con una asa, pinza o bisturí se toma un trozo del tejido interno del carpóforo (teniendo cuidado de no llegar al himenio) y se coloca dentro del tubo de ensayo, sobre el medio de cultivo. Luego de introducir el tejido dentro del tubo de ensayo, se flamea nuevamente alrededor de los mismos y se cierran con el tapón de algodón. Este procedimiento se repite con todos los tubos de ensayo disponibles (Duque, 1999).
- **Incubación en tubos de ensayo:** Los tubos deben incubarse a una temperatura entre 24 y 26 grados centígrados. Al cabo de 2 semanas, aparecerá el micelio extendiéndose e invadiendo el medio de cultivo. Cualquier coloración extraña, burbujeo, ascenso del nivel dentro del tubo u otro, será señal de contaminación habrá que empezar todo de nuevo, cuidando a cada detalle las medidas de asepsia (Duque, 1999).



Figura 24. Flameo de bisturí y tubo previo a inocular el medio de cultivo con tejido del espécimen



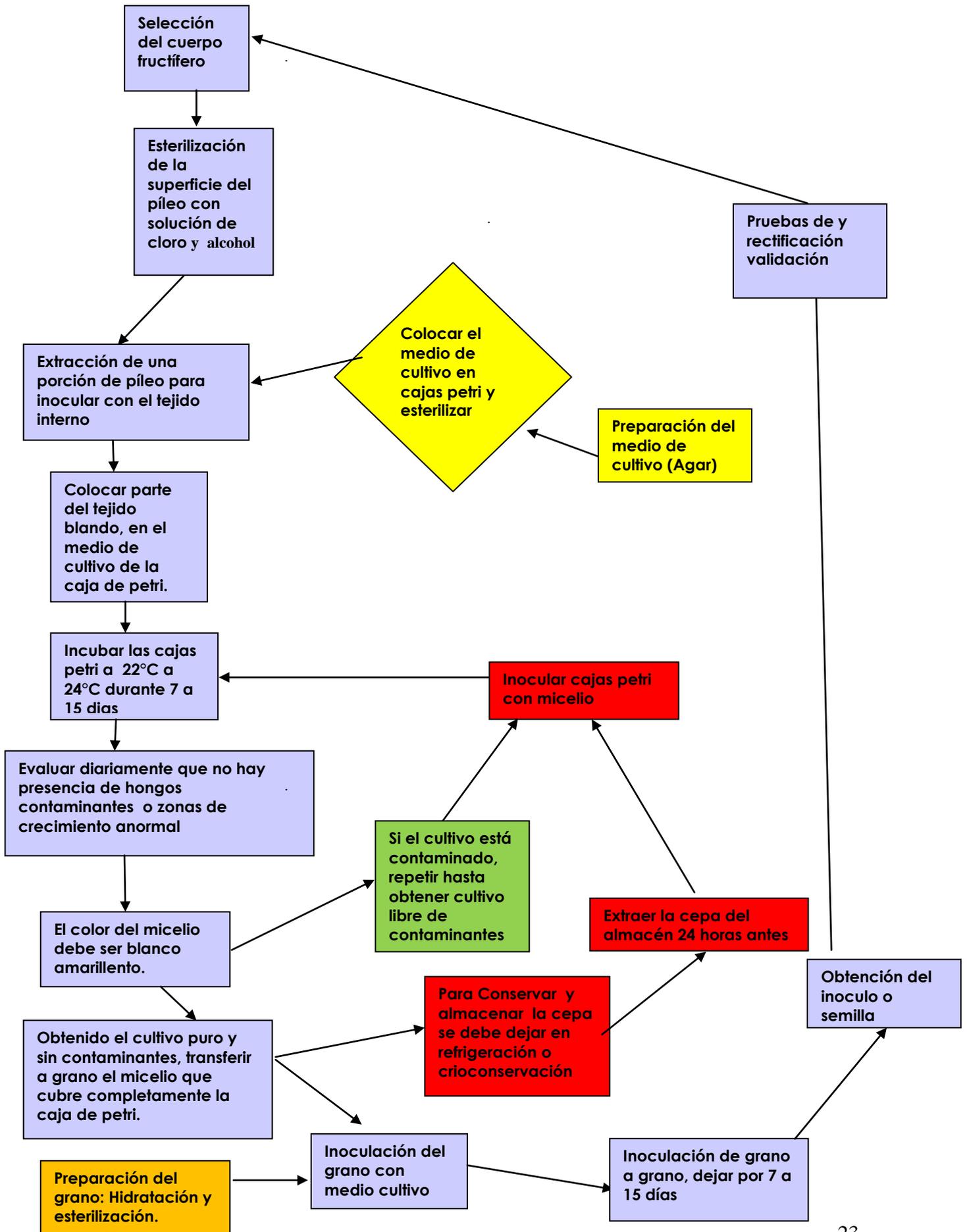
Figura 25. Toma de tejido para cultivar un clon de *Pleurotus* spp. (Sánchez y Royse, 2002)

- **Selección del micelio:** Cuando el micelio ha crecido, se selecciona aquel que posea mejor apariencia. El cultivo seleccionado es transferido varias veces a un medio de cultivo fresco para revisar el crecimiento micelial y confirmar que sea normal (cultivo puro). Los cultivos puros o axénicos deben ser entonces probados en una siembra de validación, la cual consiste en sembrar la semilla obtenida a partir del cultivo de tejido en un substrato definitivo para ratificar la productividad y la calidad del hongo (Wilkinson, V.; Royse, D. 2002).
- **Aspectos a tomar en cuenta:** Si se usa un medio que contenga ácido se puede minimizar el riesgo de contaminación. Por ejemplo, el agar ácido de papa-dextrosa-levadura (APDL) contiene ácido láctico para bajar el pH e inhibir el crecimiento bacteriano. Para ello, después de la esterilización en autoclave, se agrega estérilmente 1 ml de ácido láctico al medio y se agita suavemente. Posteriormente se vacía a los tubos de ensayo o cajas de Petri. El cultivo de tejidos debe realizarse en condiciones asépticas, al respecto Belobrajdic (2007) recomienda que durante la inoculación se tome el tubo con la mano izquierda y se sostenga el tapón de algodón entre el meñique y la palma de la mano derecha. No se deben dejar nunca los tapones ni las asas sobre la mesa de trabajo. Mantener el tubo lo más cerca

posible de la horizontal durante la inoculación para evitar que microorganismos no deseados puedan ingresar por gravedad al cultivo y trabajar siempre en la zona cercana a la llama del mechero. Las bocas de tubos y matraces de donde se toman los inóculos y de los que los van a recibir, deben flamearse, antes y después de introducir el asa o el bisturí. Además de destruir cualquier microorganismo que se encuentre en el borde del tubo, el flameado crea corrientes de convección hacia fuera del mismo disminuyendo el riesgo de contaminación.

- **Diagrama para la obtención de inóculo en el laboratorio:** El siguiente diagrama muestra puntualmente los pasos a seguir para la obtención de inóculo en el laboratorio y las diferentes rutas a seguir en caso de almacenar o no tener éxito para la obtención del inóculo.

Diagrama sobre la obtención se inoculo:



h. **Medios de Cultivo:** Para obtener cultivos axénicos, varios tipos de medios pueden ser utilizados. A continuación se mencionan algunos de los medios de cultivo que se usan frecuentemente para la conservación y propagación de cepas fúngicas. Todas las formulaciones son para un litro.

- **Papa, dextrosa y agar (PDA):** 200 g de papas, 14 g de dextrosa y 20 g de agar. No pele las papas, límpielas y corte las manchas. Enjuague y escurra las tiras de papa dos veces con agua. Hervir en un litro de agua las papas lavadas y cortadas durante 45 minutos a fuego lento. Después de completar el ciclo, filtre el caldo de papas. Deseche las papas y si es necesario, afore el volumen del caldo caliente a un litro con agua destilada. Agregue la dextrosa, el agar y agite suavemente.
- **Agar, papa-dextrosa y levadura (APDL):** Se toman 250 g de papas cortadas en piezas de 1.5 cm, 20 g de agar, 10 g de dextrosa anhidra y 1.5 g de extracto de levadura. Prepare en la forma descrita para el inciso anterior.
- **Agar, extracto de levadura, glucosa (AELG):** 5 g de extracto de levadura, 5 g de glucosa anhidra, 15 g de agar 15 g. Mezcle todos los ingredientes en un matraz y tápelo con papel aluminio.
- **Agar Extracto de Malta (AEM):** Este agar se vende ya preparado por algunas casas comerciales especializadas en insumos para laboratorio. El fabricante recomienda generalmente disolver 33.6 g en un litro de agua. El PDA (Papa, dextro y Agar) también es un medio de cultivo común en el mercado, el cual puede adquirirse en presentaciones de 500 y 1000 g. Se prepara disolviendo 39 g en un litro de agua destilada y posterior esterilización en autoclave u olla de presión.

- **Agar de Sabouraud dextrosa (SAB):** 10 g de peptona, 20 g de dextrosa anhidra y 15 g de agar. Mezcle todos los ingredientes en un matraz y tápelo con papel aluminio.

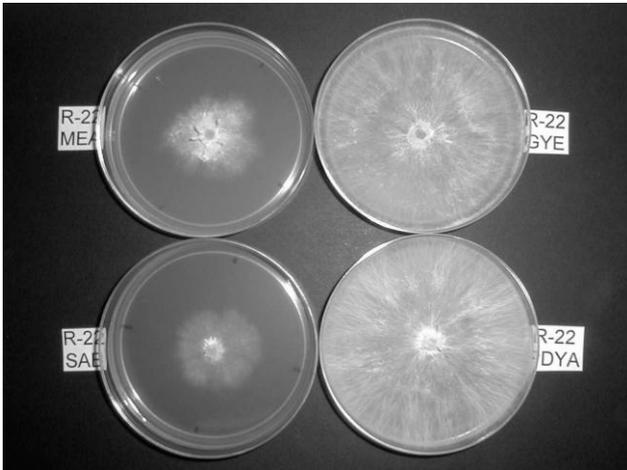


Figura 26. Crecimiento de *P. djamor* R22 sobre cuatro medios de cultivo. MEA= Agar extracto de malta; PDYA= papa dextrosa y levadura; GYE= Glucosa levadura; SAB= Sabouraud (Sánchez y Royse 2002).

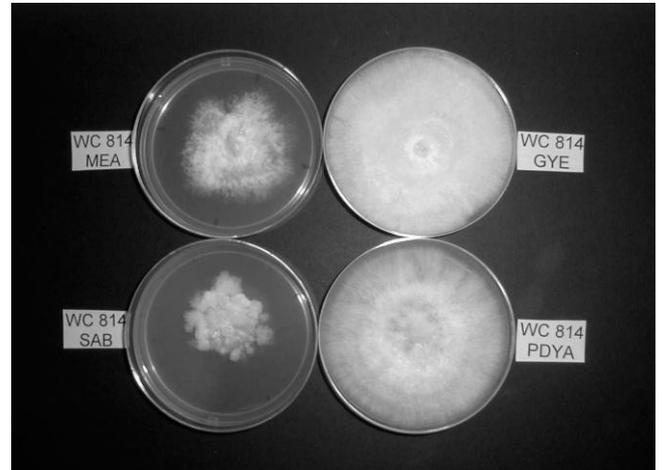


Figura 27. Crecimiento de *P. ostreatus* WC814 sobre cuatro medios de cultivo. (Sánchez y Royse 2002).

- Fuentes de cepas:** Existen en varias partes del mundo colecciones biológicas destinadas a la preservación de material genético de hongos, así como laboratorios de investigación que conservan las cepas fúngicas que son de interés propio o laboratorios productores de semilla comercial. En Tapachula, Chiapas, México, está El Colegio de la Frontera Sur -ECOSUR- y en nuestro país, la Micoteca de Macromicetos de Guatemala “Lic. Rubén Mayorga” del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC, adscrita desde el 2002 a la Asociación Latinoamericana de Micología -ALM-. En estas instituciones se puede adquirir cepas puras de hongos comestibles para fines de investigación y el inóculo para producción de carpóforos.
- Transferencia de agar a agar:** En el momento que es obtenido el cultivo, debe ser mantenido en un estado productivo. El mantenimiento

del cultivo es un paso crítico para la producción consistente de semilla de calidad predecible. La transferencia de agar a agar o subcultivo, es el método más popular. La propagación vegetativa del hongo no es complicada, pero requiere de mucho trabajo, especialmente si se tienen que conservar muchas cepas. Se usa una pequeña cantidad de micelio de un cultivo madre para inocular múltiples tubos inclinados de agar fresco (las cuales resultan ser los cultivos hijos). Estos cultivos se revisan después de incubarlos más o menos a 25°C por 7-10 días para constatar que estén presentes las características típicas del cultivo madre. Un cultivo seleccionado entre estos se convierte entonces en el “nuevo” cultivo madre, el cual se refrigera a 4° C. Después de cuatro o seis meses este cultivo es transferido a tubos inclinados con medio recién preparado para repetir el ciclo. Este método tiene dos inconvenientes: uno derivado del riesgo de contaminaciones durante las transferencias que son frecuentes, y dos, el riesgo de seleccionar mutantes, generalmente con capacidades disminuidas. La degeneración de la cepa puede ocurrir debido a la transferencia tardía y reiterada de ésta a medios de cultivo fresco.

Se prefieren los tubos con tapa de rosca de 16×160 mm (la tapa no se cierra herméticamente para permitir el intercambio de aire). Los medios contenidos en cajas de Petri no se conservan tan bien en el refrigerador como en tubos, porque el medio en caja de Petri se reseca rápidamente. Además de que debido a la mayor superficie expuesta al aire, facilita las contaminaciones. Los cultivos deben ser observados muy de cerca para no permitir que sobrepasen el estado de madurez antes de ser almacenados. Dado que el micelio del hongo continuará creciendo en el refrigerador, se debe almacenar cuando aún tiene espacio para crecer dentro del tubo. Algunas especies fructifican en el medio, por lo que deberán ser almacenadas antes de que alcancen esta etapa (Duque, 1999).

Es posible conservar una cepa por largo o corto tiempo por medio de la transferencia agar-agar. Al retirarla del almacenamiento, estará lista para preparar semilla inmediatamente, ya que este método no requiere tiempo para que la cepa se recupere del almacenamiento. Las piezas

de agar se toman a aproximadamente 0.5 cm de distancia del trozo original. El tamaño del inóculo no debe exceder 9 mm² para minimizar la transferencia de productos acumulados en el agar viejo. La transferencia debe hacerse bajo un estricto programa y debe mantenerse un ambiente consistente para mantener una máxima calidad. Se deben hacer observaciones frecuentes de la morfología del cultivo micelial para detectar anomalías que se puedan presentar durante la incubación.

VI. OBJETIVOS

General

- Elaborar una guía de Buenas Prácticas para mejorar la calidad de la producción de inóculo de hongos comestibles del género de pleurotus.

Específicos

- Establecer los requisitos técnicos requeridos para aplicar Buenas Prácticas para mejorar la calidad del proceso de producción de inóculo o semilla de hongo comestible de la especie de pleurotus.
- Brindar las bases para generar una normativa que se pueda incorporar a un sistema de calidad con fines de certificación

**Guía para el Establecimiento y Control
de Buenas Prácticas para la producción
de inóculo de hongos comestibles
(*Pleurotus ssp*)**

VII. Guía para el Establecimiento y Control de Buenas Prácticas en la producción de inóculo de hongos comestibles (*Pleurotus ssp*)

CONDICIONES DE LAS INSTALACIONES Y LOS ALREDEDORES DEL LABORATORIO DE HONGOS COMESTIBLES

1. INSTALACIONES FISICAS DEL AREA DE LABORATORIO:

1.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL LABORATORIO: El laboratorio debe contar con un tamaño apropiado al volumen de producción y debe cumplir con los siguientes requisitos de construcción y diseño:

- a)** El laboratorio debe estar separado y aislado del área de producción.

- b)** El aire debe ser filtrado y el filtro se debe cambiar en base a un programa regular. La presión en las diferentes áreas puede ser ejercida por un manejador de aire compuesto por un ventilador centrífugo y una unidad condensadora de potencia adecuada (según las dimensiones), además debe estar provisto además en cada salida por filtros estériles y prefiltros para proporcionar la tasa de empolvamiento que se requiere (16).

- c)** La dirección de la corriente de aire no deberá ir nunca de una zona contaminada a una zona limpia y las aberturas de ventilación estarán protegidas por mallas para evitar el ingreso de agentes contaminantes.

- a)** El laboratorio y todas sus áreas debe estar debidamente iluminado con luz natural o artificial, de forma tal que posibilite la realización de las tareas y no comprometa la higiene; la luz puede ser una mezcla de luz natural y artificial que garantice una intensidad mínima de:
 - i.** 540 Lux (50 candelas/pie²) en todos los puntos de inspección en el laboratorio.

- ii. 220 Lux (20 candelas/pie²) en locales de elaboración de reactivos y preparación de materiales.
 - iii. 110 Lux (10 candelas/pie²) en otras áreas del laboratorio donde las tareas son menos minuciosas como el área de vestir o amortiguamiento.
- d) Las lámparas y todos los accesorios de luz artificial ubicados en el áreas del laboratorio deben estar protegidas contra roturas, La iluminación no deberá alterar los colores en ninguna de las áreas.
- e) Las instalaciones eléctricas en caso de ser exteriores deben estar recubiertas por tubos aislantes, no permitiéndose cables colgantes sobre las zonas de trabajo.
- f) Deben existir cuatro áreas importantes en el laboratorio para mantener la asepsia necesaria que son: área de siembra, el área limpia, el área de amortiguamiento y el área de vestir.
- g) El área de vestir debe ser un área semiestéril y acondicionado para ducharse, vestirse con uniformes blancos y estériles, debe existir un mínimo posible de partículas de polvo por pie cúbico de 100,000 (pp) y 2 milímetros columna de agua de presión ambiental.
- h) El área de amortiguamiento también es un área semiestéril en el cual el personal se lava correctamente las manos y se prepara para entrar al área limpia. Esta área debe tener un mínimo posible de partículas de polvo por pie cúbico de 10,000 (pp) y 3 milímetros columna de agua de presión ambiental.
- i) El área limpia es un área estéril en donde se maneja una asepsia rigurosa, se preparan medios de cultivo, material estéril, tubos de ensayo, reactivos, materiales que van a ser usados en el área de siembra, etc. Esta área debe tener un mínimo posible de partículas

de polvo por pie cúbico de 1000 a 3,000 (pp) y 4.5 milímetros columna de agua de presión ambiental.

- j)** El área de siembra debe ser una zona totalmente restringida y de acceso restringido, debe contar con una cámara de flujo laminar para facilitar la transferencia de inóculo a la semilla estéril. Esta área debe tener un mínimo posible de partículas de polvo por pie cúbico de 100 (pp) y 6 milímetros columna de agua de presión ambiental.
- k)** La temperatura debe estar controlada entre 22 y 24°C, no se debe exceder de 26 °C y no se debe bajar a 0 °C ya que el micelio puede dañarse. Se debe llevar un registro de temperatura para lo cual se recomienda utilizar un termómetro debidamente calibrado.
- l)** En el caso del laboratorio es conveniente mantener una condición baja de humedad para no favorecer la aparición de microorganismos, se recomienda monitorear la humedad con un higrómetro debidamente calibrado.
- m)** No se debe exponer el micelio a polvo, aromas a pintura, desinfectantes, sustancias químicas u olores tóxicos ya que estos pueden dañar severamente el micelio y degenerarlo.
- n)** Se debe disponer de espacio suficiente para realizar el trabajo de laboratorio en condiciones de seguridad, limpieza y mantenimiento del área.
- o)** Las paredes, los techos y el piso debe ser lisos, fáciles de limpiar, impermeables a los líquidos y resistentes a los productos químicos y desinfectantes normalmente utilizados en el laboratorio, el piso debe ser antideslizante.
- p)** Las paredes del interior del laboratorio deben ser lavadas y pintadas con pintura anticorrosiva de color claro y de buena calidad (16).

- q)** Las uniones entre los pisos y las paredes deben ser redondeadas para facilitar su limpieza y evitar la acumulación de materiales que favorezcan la contaminación. Las uniones entre una pared y otra, así como entre éstas y los pisos, deben ser cóncavas.
- r)** Los pisos deben tener desagües y una pendiente adecuada, que permitan la evacuación rápida del agua y evite la formación de charcos.
- s)** Cualquier espacio que quede en las ventanas debe sellarse con hule espuma, para evitar que entren animales o contaminantes.
- t)** Las superficies de trabajo deben ser impermeables y resistentes a desinfectantes, ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y calor moderado.
- u)** La iluminación será adecuada para todas las actividades. Se evitarán los reflejos y brillos molestos.
- v)** Contar con un diseño que no permita el ingreso de animales, insectos, roedores, plagas u otros contaminantes del medio como humo, polvo, vapor u otros.
- w)** El área de amortiguamiento debe tener vestidores y muebles adecuados para guardar implementos de uso personal y los alimentos se debe quedar en un área específica para ingerir alimentos.
- x)** En las diferentes áreas de trabajo de laboratorio por seguridad y para facilitar la limpieza se deben dejar espacios de trabajo entre el equipo y las paredes de por lo menos 50 centímetros y sin obstáculos, de manera que permita a los empleados realizar sus deberes de limpieza en forma adecuada (4).

- y)** En el área de laboratorio no se permite utilizar madera como una de los materiales de construcción.

- z)** Los techos deberán estar contruidos y acabados de forma lisa de manera que reduzcan al mínimo la acumulación de suciedad, la condensación, formación de mohos, y las costras para evitar el desprendimiento de partículas que puedan contaminar al micelio. Las uniones entre techo y pared deben ser cóncavas para facilitar la fácil limpieza.

- aa)** Las ventanas deberán ser fáciles de limpiar, estar contruidas de modo que impidan la entrada de agua y plagas, y cuando el caso lo amerite, estar provistas de malla contra insectos que sea fácil de desmontar y limpiar con un cierre hermético.

- bb)** Cuando no se disponga de ventilación mecánica, las ventanas deberán poder abrirse y de ser posible, estarán provistas de mosquiteras.

- cc)** Los quicios¹ de las ventanas deberán ser con declive y de un tamaño que evite la acumulación de polvo e impida su uso para almacenar objetos.

- dd)** Las puertas deben tener una superficie lisa y no absorbente así como de fácil limpieza y desinfección. Deben abrir hacia fuera y estar ajustadas a su marco y en buen estado.

- ee)** Las puertas que comuniquen al exterior del área de laboratorio, deben contar con protección para evitar el ingreso de plagas.

¹ quicio s. m. Parte de una puerta o ventana en la que están los goznes y las bisagras.

- ff)** Debe existir una ventilación adecuada para: evitar el calor excesivo, permitir la circulación de aire suficiente, evitar la condensación de vapores y eliminar el aire contaminado de las diferentes áreas.

- gg)** La tubería será de tamaño y diseño adecuado al trabajo que se realizara en el laboratorio e instalada y mantenida para que evite que las aguas negras o aguas servidas no constituyan una fuente de contaminación.

- hh)** El laboratorio debe un sistema e instalaciones adecuadas de desagüe y eliminación de desechos. Deben ser diseñados, construidos y mantenidos de manera que se evite el riesgo de contaminación y abastecimiento de agua potable; además, contar con una rejilla que impida el paso de roedores hacia la planta.

- ii)** Para el sistema de seguridad de laboratorio se debe tomar en cuenta medios de protección contra incendios y emergencias eléctricas, así como duchas para casos de urgencia y medios para el lavado de los ojos.

- jj)** Debe existir un espacio, local o sala de primeros auxilios, convenientemente equipados y fácilmente accesibles en caso de accidente en el laboratorio.

- kk)** Es esencial un suministro fiable y adecuado de gas. La instalación debe ser objeto del debido mantenimiento y deben colocarse los tambos de gas fuera del laboratorio con una conexión hacia adentro represente el menor peligro posible.

- ll)** Cuando se planifique una nueva instalación, habrá que prever un sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación. (27).

mm) Debe disponerse de un suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, así como de un sistema de iluminación de emergencia que permita salir del laboratorio en condiciones de seguridad.

nn) Debe existir un local aparte para comer y beber y para descansar del trabajo del laboratorio, en este local se debe contar con un lugar donde dejar los alimentos.

1.2 INSTALACIONES SANITARIAS: El laboratorio debe estar equipado con facilidades sanitarias adecuadas tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- a)** El agua del laboratorio debe ser agua potable la cual debe cumplir con la norma Coguanor 29001.
- b)** Debe disponerse de abastecimiento suficiente de agua potable para con instalaciones apropiadas para su almacenamiento, de manera que si ocasionalmente el servicio es suspendido, no se interrumpan los trabajos a realizar en el laboratorio.
- c)** Se debe verificar y monitorear periódicamente la calidad de agua requerida según el inciso a.

1.3 SERVICIOS SANITARIOS, VESTIDORES Y DUCHAS: El laboratorio debe contar con el número de servicios sanitarios necesarios, accesibles y adecuados, ventilados e iluminados que cumplan con:

- a)** Instalaciones sanitarias limpias y en buen estado, separadas por sexo, con ventilación hacia el exterior, provistas de papel higiénico, jabón desinfectante, dispositivos para secado de manos, basureros, separadas del área limpia del laboratorio, estos pueden estar en el área de amortiguamiento y deben tener contar con lo siguiente (4):
 - Un Inodoros por cada veinte hombres, o fracción de veinte, uno por cada quince mujeres o fracción de quince.
 - Un Orinal por cada veinte trabajadores o fracción de veinte.

- Una Ducha por cada veinticinco trabajadores, en los establecimientos que se requiera
 - Un lavamanos por cada quince trabajadores o fracción de quince, en buen estado para lavarse y secarse las manos higiénicamente, no accionados manualmente y abastecidos de agua potable el cual debe contener Jabón o su equivalente, debe ser desinfectante y estar colocado en su correspondiente dispensador. También debe haber Toallas de papel o secadores de aire y rótulos que le indiquen al trabajador como lavarse las manos (4).
- b)** Puertas adecuadas que no abran directamente hacia el área amortiguamiento que es un área semiestéril, puede contar con medidas alternas que protejan contra la contaminación, tales como puertas dobles o sistemas de corrientes positivas.
- c)** Debe contar con un área de vestidores, la cual se habilitará dentro o anexa al área de servicios sanitarios, tanto para hombres como para mujeres.
- d)** Se le debe proveer al personal de un casillero para evitar el ingreso de objetos o plagas al laboratorio.
- e)** Se debe tomar en cuenta como medida de Control que:
- Los Sanitarios estén separados por género y en número de acuerdo al personal que labora en el laboratorio.
 - Cada Lavamanos debe contar con jabón desinfectante y toallas de papel o secador.
 - El área de los lavamanos cuente con rótulos que recuerden el lavado correcto de manos.
 - Se cuente con un programa de Limpieza.
 - Se tengan los registros de limpieza y abastecimiento de instalaciones sanitarias.
 - Verificaciones en cada unos de los sitios mencionados

- Se tengan fichas técnicas de los desinfectantes usados
- f) Se debe tomar en cuenta para el monitoreo lo siguiente:
- Se debe contar con un programa de Limpieza que describa como se debe realizar la limpieza, quien lo debe hacer, periodicidad y el responsable de la supervisión así como el instructivo de llenado del formato.
 - Un Formato de Registro debidamente llenado.
 - Una lista de verificación del estado de las instalaciones sanitarias.
 - Un formato de revisión de desinfectantes utilizados.

2. SALUD E HIGIENE DEL PERSONAL

2.1 PERSONAL: Es aconsejable que el personal que trabaje en el laboratorio tenga conocimientos elementales de micología (o microbiología) y esté entrenado en el uso de la técnica estéril porque el trabajo de conservación de cepas requiere concentración, atención a los detalles y una buena coordinación de ojos y manos (16). Toda personal que del laboratorio debe cumplir con lo siguiente:

- a) Las uñas de las manos deben estar cortas, limpias y sin esmaltes.
- b) No usar anillos, aretes, relojes, pulseras o cualquier otro objeto que pueda contaminar el área limpia del laboratorio.
- c) Utilizar bata blanca de manga larga y calzado antideslizante.
- d) Se debe usar redecillas y mascarilla.
- e) Si es necesario usar guantes que debe estar en buen estado, y deben ser de material impermeable cambiarse a diario o cuando el caso amerite.
- f) No deberá utilizar maquillaje, uñas o pestañas postizas.
- g) Evitar comportamientos que puedan ingresar contaminación a las áreas de laboratorio, por ejemplo:
 - Fumar
 - Escupir
 - Masticar o comer

- Estornudar o toser
- h) El personal de laboratorio no debe trabajar o atravesar las áreas de producción antes de entrar al laboratorio.
- i) No se debe introducir alimentos, plantas ya que pueden consigo moscas, hongos, bacterias, ácaros, etc. que pueden contaminar el laboratorio y los cultivos.

2.2 CAPACITACION: Toda persona involucrada en el trabajo del laboratorio debe estar debidamente capacitado y tener la competencia necesaria para realizar dicha función. Debe existir un programa de capacitaciones según las necesidades del personal que labora en el laboratorio deben saber sobre:

- Principios de microbiología
- Buenas prácticas de laboratorio
- Medidas de seguridad
- Limpieza y material de laboratorio, entre otras.

Los errores humanos y las técnicas incorrectas pueden poner en peligro incluso las mejores medidas destinadas a proteger al personal de laboratorio. Por esta razón, el elemento clave para prevenir las infecciones adquiridas, los incidentes y los accidentes en el laboratorio es un personal preocupado por la seguridad y bien informado sobre la manera de reconocer y combatir los peligros que entraña su trabajo en ese entorno. En consecuencia, la formación continúa en el servicio acerca de las medidas de seguridad es primordial.

2.3 PRACTICAS HIGIENICAS: El personal que labora en el laboratorio deberá bañarse diariamente antes de ingresar a sus labores. Deberá lavarse las manos correctamente según el protocolo utilizado y en las siguientes ocasiones:

- a) Antes de comenzar su labor diaria.
- b) Después de cambiar de alguna actividad en el laboratorio.
- c) Después de manipular algún reactivo o sustancia.

- d) Después de llevar a cabo cualquier actividad no laboral como comer, beber, fumar, sonarse la nariz o ir al servicio sanitario.

2.4 CONTROL DE LA SALUD DEL PERSONAL: Las personas responsables del laboratorio deberán llevar un registro periódico del estado de salud de su personal. (4) No deberá permitirse el acceso al laboratorio a las personas de las que se sabe o se sospecha que padecen o son portadoras de alguna enfermedad. Cualquier persona que se encuentre en esas condiciones, deberá informar inmediatamente al encargado del laboratorio sobre los síntomas que se presentan y someterse a examen médico, si así lo indican las razones clínicas o epidemiológicas. (4). Entre los síntomas que deberán comunicarse al encargado del laboratorio para que examine la necesidad de someter a una persona a examen médico y excluirla temporalmente del trabajo de laboratorio se encuentran los siguiente síntomas:

- Ictericia
- Diarrea
- Vómitos
- Fiebre
- Dolor de garganta con fiebre
- Lesiones de la piel visiblemente infectadas (furúnculos, cortes, etc.)
- Secreción de oídos, ojos o nariz.

2.5 MEDIDAS DE CONTROL QUE SE PUEDEN REALIZAR PARA EL PERSONAL:

- a) Tener un programa de Capacitaciones.
- b) Tener la documentación con el contenido de las capacitaciones.
- c) Formato de Capacitaciones llevadas a cabo,
- d) Constancia de Capacitaciones en el expediente de cada trabajador.
- e) Registro de Capacitaciones de los últimos 10 meses.
- f) Revisión de los registros de los últimos seis meses

- g) Tarjetas de Salud vigentes.
- h) Fotocopia de carné de IGGS o Certificado Médico en caso de utilizar los servicios de un médico particular.
- i) Formato de Control de Enfermedades del último año.
- j) Programa de Control de Higiene de los Trabajadores.
- k) Formato de Control de Higiene de los Trabajadores.
- l) Verificación en sitio.
- m) Constancias de Chequeos Médicos y tratamientos médicos realizados colocados dentro del expediente de cada trabajador.

2.6 MONITOREO PARA EL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO:

- a) Registro de Control de Higiene de los Trabajadores.
- b) Revisión del Programa de Control de Higiene de los Trabajadores, en el cual debe encontrarse las instrucciones para el Control de Higiene de los trabajadores y las acciones a tomar por parte de la empresa cuando no se cumplan estas instrucciones.
- c) Revisión del contenido de las capacitaciones, ya sea en medio electrónico o escrito.
- d) Registro de Capacitaciones llevadas a cabo.
- e) Verificación en áreas de trabajo de la vestimenta, y las medidas que se deben tomar en cuenta
- f) Revisión de Tarjetas de Salud, Certificados del IGSS o certificados médicos.
- g) Registro de Control de Enfermedades del último año.
- h) Revisión de expedientes de trabajadores.

3. ALREDEDORES DEL LABORATORIO

3.1 ALREDEDORES

Se debe cuidar las condiciones alrededor del laboratorio para evitar el ingreso de plagas y contaminantes, para lo cual se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- a) Vías de acceso en buen estado, sin malezas, basura ni agua estancada.
- b) Evitar la existencia de refugios para plagas, evitar el almacenamiento de equipo en desuso, remover desechos sólidos y desperdicios, recortar la grama, eliminar la hierba y todo aquello que pueda constituir una atracción o refugio para los insectos y roedores.
- c) Mantener patios y lugares de estacionamiento limpios para que estos no constituyan una fuente de contaminación.
- d) Mantenimiento adecuado de los drenajes para evitar contaminación e infestación.
- e) Sistemas de tratamiento de desechos efectivos que prevengan contaminación.

3.2 UBICACIÓN

El laboratorio debe estar situados en zonas no expuestas a un medio ambiente contaminado y a actividades industriales que constituyan una amenaza grave de contaminación, además de estar libre de olores desagradables y no expuestas a inundaciones, separadas de cualquier ambiente utilizado como vivienda, contar con comodidades para el retiro de manera eficaz de los desechos, tanto sólidos como líquidos.

Las vías de acceso y los patios de maniobra debe encontrarse pavimentados, adoquinados, asfaltados o similares, a fin evitar la contaminación.

4. LIMPIEZA Y DESINFECCION

4.1 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LAS ÁREAS EN EL LABORATORIO:

- a) **ÁREAS LIMPIAS DEL LABORATORIO:** La sanidad en el laboratorio es de vital importancia en el mantenimiento de cepas, razón por la cual las instalaciones y el equipo deben mantenerse en un estado adecuado de limpieza y desinfección, para lo cual los desinfectantes efectivos y recomendables para las área limpias así como el área de siembra o inoculación son los siguientes:

- Etanol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 10%.

Todas las superficies de trabajo y el interior de la cámara de transferencia o campana de flujo laminar debe ser limpiadas con uno de estos desinfectantes; sin embargo nunca use estos dos al mismo tiempo. En efecto, el manual CRC de seguridad en el laboratorio indica que el cloro nunca debe ser mezclado con alcohol etílico al 70%. (16)

En el Área de siembra en la campana de flujo laminar se puede utilizar una lámpara de luz ultravioleta que provee luz UV necesaria para descontaminar el área de trabajo y matar esporas y otros organismos. Se deben tener especial cuidado con estas lámparas y seguir las indicaciones del fabricante, ya que el uso inadecuado puede dañar la vista o la piel del técnico laboratorista. Estas lámparas pueden usarse junto con los desinfectantes, pero no los reemplazan. Nunca use la luz UV al momento de trabajar en una cámara de flujo laminar porque es muy dañina tanto para los hongos como para los humanos. Nunca deje cultivos dentro de la campana cuando esté saneando con luz UV. (16)

4.2 ELABORACIÓN DE DESINFECTANTES PARA LAS ÁREAS LIMPIAS DEL LABORATORIO:

- a) ETANOL AL 70%:** Se mezcla 700 ml de alcohol etílico 190 proof con 300 ml de agua destilada. Se recomienda prepararlo de preferencia cada semana.
- b) HIPOCLORITO DE SODIO AL 10%:** Se mezcla 100 ml de cloro para uso casero con 900 ml de agua, la solución debe elaborarse diariamente porque pierde efectividad rápidamente. El cloro se consigue en las tiendas de abarrotes bajo diferentes nombres comerciales y el ingrediente activo es 5.25% de hipoclorito de sodio.

4.3 LIMPIEZA DEL MATERIAL DE LABORATORIO: La limpieza consiste en la eliminación de suciedad, materia orgánica y manchas. Incluye el cepillado, la aspiración, el desempolvado en seco, el lavado o el fregado con un paño y agua con jabón o detergente. La suciedad, la tierra y la materia orgánica pueden albergar microorganismos e interferir con la acción de los descontaminantes (antisépticos, germicidas químicos y desinfectantes). La limpieza previa es fundamental para conseguir una correcta desinfección o esterilización. Muchos productos germicidas sólo son activos sobre material previamente limpio. La limpieza previa debe llevarse a cabo con cuidado para evitar la exposición a agentes infecciosos. Deben utilizarse materiales que sean químicamente compatibles con los germicidas que vayan a utilizarse después. Es muy frecuente utilizar el mismo germicida químico para la limpieza previa y la desinfección (27).

4.4 DESCONTAMINACIÓN DE ESPACIOS Y SUPERFICIES: La descontaminación del espacio, el mobiliario y el equipo de laboratorio requiere una combinación de desinfectantes líquidos y gaseosos. Las superficies pueden descontaminarse con una solución de hipoclorito sódico (NaOCl); una solución que contenga 1 g/l de cloro libre puede ser apropiada para la limpieza general, pero se recomiendan soluciones más potentes (5 g/l) cuando se trate de situaciones de alto riesgo. Para la descontaminación de espacios y superficies, las soluciones de lejía pueden sustituirse por fórmulas que contengan un 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las salas y el equipo pueden descontaminarse por fumigación con formaldehído gaseoso, que se obtiene calentando paraformaldehído o hirviendo formol. Este procedimiento es sumamente peligroso y debe ser realizado por personal especialmente adiestrado. Todas las aberturas del local (ventanas, puertas, entre otros) deben cerrarse con cinta adhesiva o un material análogo antes de que se desprenda el gas. La fumigación debe efectuarse a una temperatura ambiente de al menos 21 °C y una humedad relativa del 70%. Tras la fumigación, la zona debe ventilarse completamente antes de permitir la

entrada de personal. Toda persona que entre en la sala antes de la ventilación habrá de llevar mascarillas respiratorias apropiadas. Para neutralizar el formaldehído puede utilizarse bicarbonato amónico gaseoso. La fumigación de espacios reducidos con vapores de peróxido de hidrógeno también es eficaz, pero requiere equipo especializado para generar el vapor (28).

4.5 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DEL LABORATORIO EN EL

AUTOCLAVE: La aplicación de vapor de agua saturado a presión (tratamiento en autoclave) es el medio más eficaz y fiable de esterilizar material del laboratorio. Para la mayoría de los propósitos, los ciclos siguientes garantizarán la esterilización del contenido de la autoclave siempre que se haya cargado correctamente (27):

- 1. 3 minutos a 134 °C
- 2. 10 minutos a 126 °C
- 3. 15 minutos a 121 °C
- 4. 25 minutos a 115 °C.

4.6 ASPECTOS IMPORTANTES DEL PROGRAMA DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN:

a) Debe existir un programa escrito que regule la limpieza y desinfección del laboratorio, equipos y utensilios, el cual deberá especificar lo siguiente:

- Distribución de limpieza por áreas
- Responsable de tareas específicas
- Método y frecuencia de limpieza
- Medidas de vigilancia

b) Los productos utilizados para la limpieza y desinfección deben contar con registro emitido por la autoridad sanitaria correspondiente, previo a su uso en el laboratorio.

- c) Los desinfectantes deben almacenarse adecuadamente, fuera del área de laboratorio, debidamente identificados y utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- d) En el área del laboratorio, las superficies, los equipos y utensilios deben limpiarse y desinfectarse cada vez que sea necesario.
- e) No utilizar en área aséptica, almacenamiento y distribución, sustancias odorizantes o desodorantes en cualquiera de sus formas que puedan afectar el desarrollo y crecimiento del micelio.
- f) Se debe tener cuidado durante la limpieza de no generar polvo ni salpicaduras que puedan contaminar los medios de cultivo y afectar al micelio.

4.7 MEDIDAS DE CONTROL AL PROGRAMA DE DESINFECCIÓN Y LIMPIEZA:

- a) Como parte de las medidas de Control que se deben llevar a cabo tomar en cuenta los siguiente:
 - Programa escrito que regule la limpieza y desinfección de la planta, frecuencia, equipos y utensilios.
 - Fichas técnicas y registros sanitarios de detergentes y desinfectantes utilizados.
 - Formato de limpieza incluyendo áreas, persona responsable, métodos de limpieza, verificación y firma de supervisor.
 - Inspección in situ.

4.8 MONITOREO AL PROGRAMA DE DESINFECCIÓN Y LIMPIEZA:

- a) Revisión del programa de limpieza y en caso existir una acción correctiva que aplicar a este.
- b) Revisiones periódicas a los siguientes aspectos:
 - i. Medidas correctivas tomadas y resultados de las mismas.
 - ii. Registros de limpieza por áreas.
 - iii. Fichas técnicas y registros sanitarios de Productos utilizados.
 - iv. Inspección del área de almacenamiento de detergentes y desinfectantes.

5. MANEJO, DISPOSICION, DESCONTAMINACION DE DESECHOS Y AREAS EN EL LABORARTORIO:

5.1 MANIPULACIÓN DE DESECHOS: Se considera desecho todo aquello que debe descartarse. En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, son pocos los materiales contaminados que es preciso retirar del laboratorio o destruir. La mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse o se recicla. El principio básico es que todo el material infeccioso ha de ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. El tratamiento en el laboratorio debe ser una Descontaminación que Consiste en (27):

- a)** Hacer un tratamiento en autoclave de vapor que constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación. El material destinado a la descontaminación y eliminación debe introducirse en recipientes (por ejemplo en bolsas de plástico resistentes al tratamiento en autoclave) que tengan un código de color para indicar si el contenido ha de pasar a la autoclave o a la incineración. (27)
- b)** Para la descontaminación de cajas petri, tubos de ensayo, pipetas, beacker etc, se recomiendan hipocloritos y desinfectantes de alto nivel y las soluciones de hipoclorito recién preparadas contendrán cloro disponible a razón de 1 g/l para uso general (27).
- c)** Para la desinfección de superficies puede utilizarse glutaraldehído(27).
- d)** Los instrumentos se sumergirán en hipoclorito sódico (20 g de cloro libre por litro: 2%) durante 1h, y a continuación se enjuagarán cuidadosamente en agua antes de tratarlos en la autoclave (27).
- e)** Los instrumentos que no puedan tratarse en la autoclave pueden limpiarse mojándolos repetidamente con hipoclorito

sódico (20 g de cloro libre por litro: 2%) durante 1h. Se enjuagará cuidadosamente a fin de eliminar los residuos de hipoclorito sódico (27).

5.2 GERMICIDAS QUIMICOS: La actividad germicida de muchas sustancias químicas es más rápida y eficaz a temperaturas más altas, pero las temperaturas elevadas también pueden acelerar su evaporación y degradarlas. Es preciso tener particular cuidado en el uso y el almacenamiento de esas sustancias en las regiones tropicales, donde su tiempo de conservación puede verse reducido a causa de las altas temperaturas del ambiente. Muchos germicidas pueden ser perjudiciales para el ser humano o el medio ambiente. Se deben seleccionar, almacenar, manipular, utilizar y eliminar con precaución, siguiendo las instrucciones del fabricante. En relación con la seguridad personal, se recomienda utilizar guantes, delantales y protección ocular cuando se preparen diluciones de germicidas químicos (27).

Normalmente no se necesita recurrir a germicidas químicos para la limpieza ordinaria de suelos, paredes, equipo y mobiliario, pero su uso puede ser apropiado en ciertos casos para controlar brotes (27).

5.3 DESECHOS SÓLIDOS Y BASURA: Dentro y fuera del laboratorio no se debe permitir:

- a) La acumulación de desechos dentro y fuera de las instalaciones.
- b) Los recipientes donde se depositan los desechos o basura deben ser lavables y tener tapadera para evitar que atraigan insectos y roedores.
- c) El almacenamiento de los desechos o basura, deberá ubicarse alejado del laboratorio.
- d) Como parte de las medidas de Control que se deben llevar a cabo tomar en cuenta los siguiente:
 - La remoción de basura externa se debe hacer por lo menos una vez al día.

- La remoción de basura en el laboratorio por lo menos dos veces por día.
 - Los Basureros o recipientes contenedores de basura deben ser fáciles de lavar y estar tapados.
- e)** Para el monitoreo en el laboratorio tomar en cuenta lo siguiente:
- Verificar que sea retirada la basura externa una vez al día e interna dos veces por día.
 - Verificación in situ de los basureros y recipientes, de fácil limpieza, tapados y alejados del área de producción.
 - Llevar registros de cada verificación

5.4 CONTROL DE PLAGAS EN EL LABORATORIO: El laboratorio debe contar con un programa escrito para controlar todo tipo de plagas, que incluya como mínimo:

- a)** Identificación de plagas
- b)** Mapeo de Estaciones.
- c)** Productos o Métodos y Procedimientos utilizados.
- d)** Hojas de Seguridad de los productos (cuando se requiera)
- e)** Productos químicos deben estar registrados y autorizados por la autoridad competente.
- f)** Tomar en cuenta las siguientes medidas de Control :
 - Programación de inspecciones internas.
 - Programación de inspecciones externas. (Si se cuenta con una empresa externa para el control de plagas).
 - Mapa de ubicación de trampas colocadas en la planta y alrededores.
 - Formato de inspecciones internas y externas.
 - Licencia de Funcionamiento de Empresa de Control de Plagas
 - Listado de Productos utilizados.

- Fichas técnicas y registros sanitarios de Plaguicidas utilizados.
- Inspección en sitio.

g) Para el monitoreo tomar en cuenta lo siguiente:

- Registro de inspecciones realizadas tanto internas como externas.
- Medidas correctivas tomadas y resultados de las mismas.
- Fotocopia de la licencia de Funcionamiento de la Empresa de Control de plagas.
- Revisión de los listados de Productos utilizados.
- Revisión de Fichas técnicas y registros sanitarios de Productos utilizados.
- Inspección de bodega de almacenamiento de pesticidas y plaguicidas.

6. EQUIPOS Y MATERIAL NECESARIO PARA EL LABORATORIO PRODUCTOR DE INOCULO:

6.1 EQUIPO Y MATERIAL NECESARIO PARA LA IMPLEMENTACION DE

UN LABORATORIO PRODUCTOR DE INOCUOLO: Con el equipo y material de laboratorio así como la cristalería se debe evitar la contaminación del inoculo, el equipo y material deben estar diseñados y construidos con los siguiente requisitos:

- a)** Deben ser de fácil acceso para su inspección, mantenimiento y limpieza.
- b)** Deben funcionar de conformidad con el uso al que está destinado.
- c)** No deben transferir sustancias tóxicas, olores, ni sabores al inoculo.
- d)** No deben ser ni corrosivos, resistentes a la corrosión de los reactivos y a las operaciones repetidas de limpieza y desinfección.
- e)** Se deben tomar en cuenta las siguientes medidas de Control:
 - Programa escrito de mantenimiento preventivo, que incluya especificaciones del equipo.

- Formato de mediciones de instrumentos utilizados en el proceso.
- Formato de mediciones de temperaturas, humedad de cuartos fríos y congela

a) Para el monitoreo tomar en cuenta lo siguiente:

- Registro de las reparaciones y condiciones de los equipos.
- Registros de instrumentos utilizados.
- Registro de las mediciones de temperaturas, y humedad, congeladores, autoclaves incubadoras, entre otros.

6.2 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE PRODUCTOR DE INOCULO: El material y

equipo necesario consiste en los siguiente (16):

- Balanza
- Estufa (opcional)
- Autoclave
- Cámara de transferencia o de flujo laminar
- Mechero Mantenimiento de área estéril
- Desecador Producción de esporadas
- Armario para almacenamiento de materiales y enseres
- Lavadero Enjuague y lavado de materiales
- Anaqueles Resguardo de medios
- Cristalería (Matraces, cajas de petri, vasos de precipitado, probeta, tubos propagación y conservación de las cepas).
- Microscopio Control de calidad de las cepas
- Refrigerador y termo para nitrógeno líquido

6.3 PROGRAMA DE MANTENIMIENTO: Debe existir un programa escrito de mantenimiento preventivo, a fin de asegurar el correcto funcionamiento del equipo. Dicho programa debe incluir especificaciones del equipo, el registro de las reparaciones y condiciones.

7. CONTROL EN EL PROCESO Y EN LA PRODUCCIÓN DE INOCULO

7.1 TECNICAS DE OBTENCION: La semilla o blanco de hongo se refiere en este caso al micelio del hongo utilizado para inocular un sustrato. Este material es empleado para sembrar cuando se cultivan hongos (Para ver las técnicas de producción de inóculo en marco referencial pag 26 a la 35). Para la obtención de semilla existen dos tipos:

- Semilla madre, master o primaria
- Semilla secundaria

Para garantizar la técnica de obtención del inóculo se debe tomar en cuenta recomendaciones de limpieza y desinfección durante el proceso las cuales consisten en:

- El equipo y la cristalería a utilizar debe mantenerse limpia y desinfectada durante el proceso y que este no represente una contaminación al inóculo.
- El proceso de producción de semilla, el empaque y almacenamiento no represente una contaminación directa o indirecta al inóculo para lo cual se lleven los controles respectivos de limpieza y desinfección.
- Garantizar el adecuado manejo de operaciones unitarias y factores (Esterilizaciones, manejo de temperaturas, humedad, pH, calidad de agua, etc.) utilizados en el proceso, el empaque y el almacenamiento de inóculo para que esto no represente un peligro de deterioro o contaminación del inóculo y que ayude a tener estricto control en los procesos.

7.2 SEMILLA PRIMARIA: También conocida como *inóculo primario*, proviene directamente del micelio del hongo cultivado sobre un medio a base de agar, para su preparación el sustrato empleado se inocula con un trozo de agar y se prepara el inóculo sobre granos. Se debe tener un

área demostrativa o de evaluación, en donde la semilla sea valorada según sus características productivas.

7.3 SEMILLA SECUNDARIA: Esta es inoculada con inóculo primario de crecimiento activo, para preparar inóculo secundario se utilizan desechos agrícolas, se pueden utilizar diferentes tipos de recipientes, por ejemplo el inóculo primario en botellas y el inóculo secundario en bolsas de plástico termorresistente.

7.4 MATERIAS PRIMAS Y REACTIVOS: Para los insumos, materiales y sustratos, reactivos, y la cristalería para la producción de inóculo, se deberá tener proveedores confiables que extiendan certificados de la calidad requerida de sus productos. Se deberá tener condiciones sanitarias que garanticen su inocuidad y el cumplimiento con los estándares establecidos, para lo cual deberá contar con un sistema documentado de cada proveedor con la siguiente información:

- Especificaciones del producto
- Fecha de vencimiento
- Número de lote
- Nombre de Proveedor
- Entradas y salidas

7.5 SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE INOCULO: Todo el proceso de producción de inóculo, incluyendo las operaciones de empaquetado y almacenamiento deberán realizarse en óptimas condiciones sanitarias siguiendo los procedimientos establecidos en el Manual de Procedimientos Operativos, el cual debe incluir:

- a) Diagramas de flujo, considerando todas las operaciones unitarias del proceso y análisis de los peligros microbiológicos, físicos, y químicos a los cuales están expuesto el inóculo durante su producción.

- b) Implementar controles de limpieza y desinfección necesarios para reducir el crecimiento potencial de microorganismos.
- c) Llevar controles de tiempo, temperatura, pH y humedad de inóculo.

7.6 EMPACADO: Todo el material de empaque que entre en contacto con el inóculo debe cumplir los siguientes requerimientos:

- a) Almacenarse en lugares adecuados para tal fin y en condiciones de sanidad y limpieza.
- b) El lugar donde se almacene debe garantizar la integridad del inóculo, bajo las condiciones previstas de almacenamiento.
- c) Los empaques e insumos que se van a emplear para el inóculo para no deben ser utilizados para ningún otro fin que pueda dar lugar a la contaminación del inóculo.
- d) Los empaques (bandejas, bolsas, recipientes, etcétera) deberán inspeccionarse y tratarse si es necesario inmediatamente antes del uso, a fin de tener la seguridad de que se encuentren en buen estado, limpios y desinfectados.

8. CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO: Los factores de calidad que se pueden tomar en cuenta para medir la calidad de la semilla o inóculo son los siguientes:

8.1 PARAMETROS DE CALIDAD DEL INOCULO: Los parámetros de productividad y calidad utilizados para el inóculo son:

- Tipo de invasión del sustrato (con vigor y muy densos son los adecuados ya que los sin vigor y ralos se consideran no adecuados)
- Tiempo de incubación de 2-4 semanas
- Tamaño de carpóforos 5 a 15 cm de diámetro
- Eficiencia biológica mayor del 100 %
- Días para inducir la fructificación 2 a 3 días después de haber puesto los pasteles bajo las condiciones ambientales necesarias aparecen los primordios de cuatro a seis días

después, dichos primordios se han desarrollado normalmente, cubren la totalidad de la superficie del pastel y están en madurez comercial, listos para ser cosechados.

- Tasa radial de crecimiento. 11 mm/día
- Tasa de incubación arriba del 2.5%

8.2 TASA DE CRECIMIENTO RADIAL: Se puede tomar en cuenta la Tasa radial de crecimiento miceliar que consiste en diámetro de la cepa dividido los días en que tardo en llegar al diámetro final reportada en por mm/día. Para algunas especies de *Pleurotus* y hongos relacionados, *P. ostreatus* ECS-0110 su tasa es de 11 mm/día (Hernández *et al.* 1995), *P. djamor* ECS-0138 su tasa es de 20.3 mm/día (Benítez *et al.* 1998), *P. djamor* ECS-0149 su tasa es de 7.15 mm/día (Benítez *et al.* 1998), *Monilia* sp. Su tasa es de 2.9 mm/h (López *et al.* 1996) y *Trichoderma viridae* su tasa es de 0.5 mm/h (Guzmán *et al.* 1993).

8.3 TASA DE INCUBACIÓN: Es la cantidad de semilla que se usa en función de la cantidad de sustrato que se pretende inocular. En el caso de especies de *Pleurotus* se han usado tasas de inoculación que varían entre 0.8 y 15%. La definición de este valor depende de las características tanto de la cepa y del inóculo, como del sustrato donde se siembra. Mientras más baja sea la tasa de inoculación, menor será el costo por compra de inóculo, pero mayor el tiempo requerido para que el hongo colonice el sustrato. Además, a mayor tiempo de colonización mayor será el riesgo de contaminación (16). En general, en la siembra comercial es común utilizar tasas de inoculación del 2-2.5%, lo que es rentable pero demuestra que la semilla no se distribuye de manera homogénea en el sustrato y que el hongo no crece a su tasa óptima de crecimiento. En condiciones rurales y usando como semilla sustrato colonizado, Bano *et al.* (1979) reportaron en la India buenos rendimientos al usar una tasa de inoculación del 15%.

8.4 PRUEBAS DE VALIDACIÓN DE CULTIVOS: No se ha desarrollado una prueba in vitro para determinar la productividad de un cultivo que ha sido almacenado. Dada esta razón una cepa puede perder una o varias características durante el almacenamiento, por lo que se debe efectuar una serie de pruebas de cultivo para determinar las características de la cepa recién recuperada. Estas pruebas involucran la preparación de la semilla con la consecuente evaluación de la producción y la obtención de datos como rendimiento, tamaño, color, forma, etc. Estas pruebas se hacen también de manera rutinaria durante el proceso de formación de una nueva variedad. En este caso, primero se realizan pruebas pequeñas y las líneas sobresalientes se propagan para pruebas más grandes con repeticiones. Todos los parámetros de crecimiento (substrato, temperatura, humedad, etc.) deben ser controlados tanto como sea posible para minimizar el riesgo de un impacto ambiental adverso en el cultivo. Cuando sea posible, una línea comercial debe ser incluida en la prueba para propósitos comparativos (16).

8.5 INFORMACIÓN QUE DEBE LLEVARA EL INOCULO A AL COMERCIALIZARLO: Para que cualquier inóculo pueda ser comercializado o puesto en circulación deberá señalarse en el envase o adjunto al mismo los siguientes datos informativos (17) :

- Nombre de la variedad y el lugar de su producción.
- Especificaciones de calidad del inóculo.
- La tolerancia del inóculo a intervalos de temperatura para almacenaje y producción.
- Instructivo para el uso óptimo del inóculo, que incluya la descripción de características de las fases vegetativa, reproductiva y vida de anaquel.
- Las zonas geográficas para las cuales se recomienda su uso.
- Nombre o denominación social del productor y su domicilio.

GLOSARIO

Adecuado- se entiende suficiente para alcanzar el fin que se persigue (27).

Antimicrobiano – Agente que mata los microorganismos o suprime su crecimiento y proliferación (27).

Antiséptico – Sustancia que inhibe el crecimiento y el desarrollo de microorganismos pero no necesariamente los mata. Los antisépticos suelen aplicarse a las superficies corporales (27).

Biocida – Término general para cualquier agente que mate organismos (27).

Descontaminación – Cualquier proceso utilizado para eliminar o matar microorganismos. También se utiliza para referirse a la eliminación o neutralización de sustancias químicas peligrosas y materiales radioactivos (27).

Desinfección – Medio físico o químico de matar microorganismos, pero no necesariamente esporas (26).

Desinfectante – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos, pero no necesariamente esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse (26).

Esporicida – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizadas para matar microorganismos y esporas (26).

Esterilización – Proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos y esporas (26).

Germicida químico – Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos (26).

Microbicida – Sustancia o mezcla de sustancias químicas que mata microorganismos. Este término se utiliza a menudo en lugar de «biocida», «germicida químico» o «antimicrobiano». a superficies u objetos inanimados (26).

Buenas Prácticas: Es una condición de Poner en práctica algo que se ha aprendido o se conoce que va a hacer útil con un propósito para algo y que va a brindar las bondades necesarias.

Buenas Prácticas de Manufactura- condiciones de infraestructura y procedimientos establecidos para todos los procesos de producción y control de alimentos, bebidas y productos afines, con el objeto de garantizar la calidad e inocuidad de dichos productos según normas aceptadas internacionalmente. (4)

Calibración: Es la comparación entre un equipo o instrumento de medición y un patrón de calibración internacional, además se calcula el nivel de error y la incertidumbre del equipo o instrumento sujeto de calibración. En esta comparación determina si el error de medición de tu equipo o instrumento esta dentro de los errores máximos permisibles (e.m.p). Quien define estos e.m.p.

Cepa: Micélio genéticamente uniforme que posee características distintivas. (3)

Croquis- esquema con distribución de los ambientes de la fábrica, elaborado por el interesado sin que necesariamente intervenga un profesional colegiado. Debe incluir los lugares y establecimientos circunvecinos, así como el sistema de drenaje, ventilación y la ubicación de los servicios sanitarios, lavamanos y duchas en su caso. (5)

Desinfección- es la reducción del número de microorganismos presentes en las superficies de edificios, instalaciones, maquinarias, utensilios, equipos, mediante tratamientos químicos o métodos físicos adecuados, hasta un nivel que no constituya riesgo de contaminación para los alimentos que se elaboren. (4)

Eficiencia biológica (%EB) = Peso de cuerpos fructíferos frescos dividido por el peso seco del sustrato por 100 nos da el % de eficiencia biológica que debe ser mayor de 100% para tomarlo como adecuado (8).

Ensayo- El ensayo puede resultar un instrumento generador de múltiples aprendizajes, por ello, este objeto de aprendizaje ha sido diseñado para que los alumnos, desde educación secundaria, desarrollen un conjunto de habilidades para elaborar un ensayo, desde su estructura y topología hasta las fases para construirlo.

Evitar- impedir en la medida en que esto sea racionalmente viable. Este término se utilizará cuando sea posible, en teoría, lograr que no haya contaminación o imponer una práctica particular. (3)

Inocuidad de los alimentos- la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se utilicen de acuerdo al uso a que se destinan. (4)

Inoculo: Micelio crecido en sustrato y preparado con el propósito de propagar hongo.

Limpieza- la eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias objetables. (4)

Lote- es una cantidad determinada de producto envasado, cuyo contenido es de características similares o ha sido fabricado bajo condiciones de producción presumiblemente uniformes y que se identifican por tener un mismo código o clave de producción. (4)

Medida de control- cualquier medida o actividad que pueda emplearse para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos, o reducirlo a un nivel aceptable.

Micelio: Es una red de hifas y parte vegetativa (no reproductiva) del hongo. (3)

Planta- es el edificio, las instalaciones físicas y sus alrededores que se encuentren bajo el control de una misma administración. (4)

Superficie de contacto con los alimentos- todo aquello que entra en contacto con el alimento durante el proceso y manejo normal del producto; incluyendo utensilios, equipo, manos del personal, envases y otros. (4)

Tasa de crecimiento radial: El crecimiento fue determinado por la medición del diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 2 días, se obtuvo en cada uno de los medios y a las diferentes temperaturas, durante un máximo de 10 días para estimar la tasa radial de crecimiento micelial (mm/día) y el diámetro final. Consiste en diámetro de la cepa dividido los días en que tardo en llegar al diámetro final reportada en por mm/día.

Tasa de inoculación: Es la cantidad de semilla que se usa en función de la cantidad de substrato que se pretende inocular.

Vida útil- el período durante el cual el producto mantiene su inocuidad e idoneidad microbiológica a la temperatura de almacenamiento especificada y, cuando proceda, en otras condiciones de almacenamiento y manipulación estipuladas.

VIII. MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS

Metodología:

Los pasos a seguir para la implementación y control de las buenas prácticas en el laboratorio de Hongos comestibles de (*pleurotus ssp*) son los siguientes:

1. Elaboración del diagnóstico de la situación actual de la planta.
2. Implementar aspectos de infraestructura en el laboratorio.
3. Elaboración de la documentación requerida en la guía.
4. Elaboración de los programas de:
 - Limpieza
 - Desinfección
 - Desechos
 - Control de plagas
 - Capacitación del personal
 - Mantenimiento de equipo y utensilios
5. Elaboración de fichas de control de:
 - Materias primas y producto terminado
 - Operaciones de producción
 - Empacado
 - Control de equipo y utensilios de laboratorio
 - Control de salud del personal
 - Control de documentos
 - Control de criterios de calidad del inóculo

Material y Equipo a Utilizar para elaborar la guía:

- Documentos escritos
- Documentos electrónicos
- Normas
- Reglamentos
- Computadora portátil.

IX. Conclusiones

- La implementación de esta guía ayudara a empresas y agricultores productores de semilla y productores de hongo ostra a introducirse en las Buenas prácticas y así conseguir mejores rendimientos de los recursos y una mayor satisfacción del cliente, además de la aceptación del producto en mercados nacionales e internacionales.
- El productor de semilla podrá ofrecer semilla, segura y de calidad comprobada, que le represente clientes satisfechos debido a rendimientos altos del producto.
- El establecimiento de la Buenas practica le permitirá al laboratorio un mayor control del gasto, de los procesos y de los resultados, y se tendrá una continua evaluación del grado de satisfacción de sus clientes, internos y externos, para así rectificar aquellos puntos susceptibles de mejora, ya que la calidad supone una oportunidad de mejora continua, promueve el cambio y la adaptación antes de que éste se convierta en crisis.

X. Recomendación

- La divulgación de este guía a agricultores y a empresas productoras de semilla o inóculo del hongo ostra contribuirá a la implementación de programas prerequisites que darán como consecuencia productos garantizados con mejores rendimientos.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Ardon, Carlos, Producción de los Hongos Comestibles, tesis de maestría, Facultad de Humanidades de la Universidad de san Carlos de Guatemala, año 2007.
2. Fogel, R 1997. Hechos increíbles de los hongos. Que es un hongo (en línea). Trad. Por Anthoni Santana. Michigan US. Consultado el 24 de junio 2008. Disponible en <http://wwwherbariun.usu.edu/fungi/funfacts/spanish/kingfactSP.htm>
3. Gaitán-Hernández, Rigoberto, Salmenes Dulce, Pérez Merlo, Rosalía, Mata, Gerardo. Manual Práctico de cultivo de setas, instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz, México 2006.
4. Reglamento Técnico Centroamericano para Industria de Alimentos y Bebidas procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios Generales. RTCA 67.01.33:06
5. Kobold, M 2000. Setas de prados y bosques: como identificarlas respetarlas, recogerlas y cocinarlas. Susaeta ediciones, S.A. Madrid España. 126p.
6. Norma General del Codex Para Los Hongos Comestibles y Sus productos, CODEX STAN 38-1981.
7. Tormo Molina R. 1996. Los hongos generalidades (en línea). Lecciones hipertextuales de botánica, España. Consultado 28 de agosto 2008. Disponible en <http://www.unex.es/polen /LHB/hongos/hongos0.htm>
8. Carmen Rosa Godoy. 1997. Tesis sobre el cultivo de una cepa mexicana de Pleurotus Ostreatus utilizando como substrato aserrín de caoba y cedro, fibra de coco y elote de maíz, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

9. Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola: Hongos (en línea). Universidad Nacional de Salta (UNSa), Facultad de Ingeniería, Buenos Aires, Argentina. 14 p. Consultado 28 de abr. 2007. Disponible en <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap7.pdf>
10. Deacon, J. 2005. The Microbial World: Basidiomycota: activities and lifestyle (en línea). Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh. Edinburgh, Texas, USA. 12 p. Consultado 16 abr. 2007. Disponible en <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbesbasidio.htm>
11. Duque, J. 1999. ¿Cómo se cultiva el champiñón ostra? (en línea). Chile. Consultado 13 abr. 2007. Disponible en <http://geocities.com/RainForest/Andes/1930/cultivo.html>
12. Quimio, T. 2002. La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp.: Preparación de la semilla. Sánchez, J. comp. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F., MX, Editorial Limusa S.A. 125-137.
13. Mendivil, J. 1996. Basidiomicetes: setas y hongos de Aragón (en línea). Aragón, España, Aragonesi. Consultado 5 mayo 2007. Disponible en <http://www.naturalezadearagon.com/hongos/index.php>
14. Romero Luengo, A. 1998. Generalidades: partes de una seta (en línea). Ciencias naturales, Micología, Toda cultura, Guadalajara, México. Consultado 19 abril. 2007. Disponible en <http://www.todacultura.com/micologia/setas.htm>
15. Sánchez Vásquez, JE. 1994. Producción de hongos comestibles. Centro de investigaciones ecológicas del Sur (CIES), San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 107 p.
16. Sánchez, J; Royse, D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F., MX, Editorial Limusa, S.A. 290 p.

17. Sánchez, J; *et al.* 2007. El cultivo de setas *Pleurotus* spp en México: Cultivo de *Pleurotus* spp y buenas prácticas de manejo para la producción de cuerpos fructíferos inocuos (en línea). Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F. Consultado 26 junio. 2007. Disponible en <http://www.ecosur.mx/EICultivodelasSetas 1.pdf>
18. Romero Luengo, A. 1998. Generalidades: partes de una seta (en línea). Ciencias naturales, Micología, Toda cultura, Guadalajara, México. Consultado 19 abril. 2007. Disponible en <http://www.todacultura.com/micologia/setas.htm>
19. Rodríguez Macias, R; *et al.* 2005. Perspectivas de producción de hongos comestibles (*Pleurotus* spp.) en la región nordeste del estado de Nuevo León (en línea). Revista SCIENTIA 8(2): 163-170. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (UCBA), Universidad de Guadalajara. Consultado 4 jul. 2007. Disponible en: http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_scientia_cucba/Scientia_8_2.pdf
20. Tormo Molina, R. 1996. Los hongos: generalidades (en línea). Lecciones hipertextuales de botánica, España. Consultado 14 abril. 2007. Disponible en <http://www.unex.es/polen/LHB/hongos/hongos0.htm>
21. Wood, M; Stevens, F. 1996. Fungi of the San Francisco bay área: *Pleurotus ostreatus* (en línea). MykoWeb, San Francisco, California, US. Consultado 5 jul. 2007. Disponible en http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html
22. Wood, M; Stevens, F. 1996. Fungi of the San Francisco bay área: *Pleurotus ostreatus* (en línea). MykoWeb, San Francisco, California, US. Consultado 5 jul. 2007. Disponible en http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html

23. Departamento de salud, educación y bienestar de los EE.UU. Manual de higiene para el servicio de Alimentos. Administración de Alimentos y Drogas (FDA) EE.UU.
24. Código Internacional de Prácticas Recomendado –Principios Generales de Higiene de los Alimentos- CAC/RCP 1-1969, Rev 4 (2003).
25. Norma Sanitaria para la Autorización y Control de Establecimientos fijos de Alimentos Preparados, No. 002-99. Ministerio de Salud y Asistencia Social, Departamento de Regulación y Control de Alimentos.
26. Reglamento para la inocuidad de los alimentos, Acuerdo Gubernativo 969_99, Ministerio de Salud y Asistencia Social, Departamento de Regulación y Control de Alimentos.
27. Manual de bioseguridad en el Laboratorio, Organización Mundial de la salud, tercera edición, Ginebra, 2005.
28. Bran, M.; Morales, E.; Cáceres, R.; González, M.; Flores, R. MEJORAMIENTO GENÉTICO Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE CEPAS NATIVAS DE PLEUROTUS SPP. Dirección General de Investigación, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Universidad de San Carlos de Guatemala.