

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

---

# PRODUCCIÓN DE SEMILLA COMERCIAL DE HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES



## PROTOCOLOS

- Producción en botellas planas
- Producción de semilla primaria
- Producción de semilla comercial
- Tabla de problemas y soluciones

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

## PRESENTACIÓN

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

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

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

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

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

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Metodologías básicas de laboratorio</b>	<b>4</b>
<b>Producción en botellas planas</b>	<b>8</b>
<b>Producción de semilla primaria</b>	<b>10</b>
<b>Producción de semilla comercial</b>	<b>13</b>
<b>Equipos de laboratorio</b>	<b>16</b>
<b>Tabla de problemas y soluciones</b>	<b>18</b>

## METODOLOGÍAS BÁSICAS DE LABORATORIO

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



### DESINFESTACIÓN DEL LABORATORIO

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

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

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

## LAVADO, SECADO Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE LABORATORIO

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

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

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

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

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

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

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

## DISPOSICIÓN DEL MATERIAL DE DESECHO

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

## PRODUCTIVIDAD



Carpóforos de *Pleurotus pulmonarius* cultivados sobre residuos agrícolas

*El éxito de la producción de semilla comercial radica en el seguimiento estricto de los protocolos que en este documento se describen, lo cual ofrece garantías en la calidad de la semilla que se verá reflejado en la productividad del cultivo.*

## PRODUCCIÓN EN BOTELLAS PLANAS

El primer paso en la elaboración de la semilla comercial de los hongos consiste en la propagación del micelio, la cual se realiza en cajas de petri o en botellas planas.



Propagación del micelio de hongos en botellas planas

Para iniciar con la producción de cepa madre se hace una propagación masiva del micelio en Agar Extracto de Malta, utilizando botellas planas y de esta manera contar con mayor cantidad de inóculo.

En esta etapa del proceso es importante la observación diaria de los cultivos miceliales con el fin de retirar el material contaminado y evitar de esta manera que se pueda presentar enmascaramiento de los contaminantes que puedan ser invadidos por el micelio de las cepas de interés, lo que ocasionaría la pérdida de la semilla primaria.

En el momento en que el micelio invada toda la superficie del agar en la botella plana y no se observe contaminación microbiana, se sella ésta con papel parafilm o vinilpel y se conserva en refrigeración a 4°C durante un tiempo no superior a los 3 meses.

## PROTOCOLO

1. Cuantificar el número de botellas planas, botellas de agua destilada estéril, probetas, beakers, erlenmeyers y asas necesarias.
2. Lavar y esterilizar el material de acuerdo a lo descrito anteriormente en las metodologías básicas de laboratorio.
3. Realizar la limpieza y desinfección del laboratorio (Ver metodologías básicas de laboratorio)
4. Mantener cerrada la puerta del laboratorio. Mantener una bata limpia, cofia y tapabocas al interior del laboratorio y una a la salida para el cambio.
5. Preparar los medios de cultivo utilizando el procedimiento referido anteriormente en este documento.
6. Retirar de la nevera el material de siembra y desinfectarlo con alcohol, 1 día antes de la siembra para permitir que se aclimate antes de utilizarlo.
7. Desinfectar la cabina de flujo laminar o el área de trabajo, encender mecheros y mantener alcohol para la desinfección constante durante el proceso de siembra.
8. Utilizando un asa previamente flameada y fría, para no quemar el micelio, trocear el micelio presente en los tubos de cultivo y adicionar un sólo pedazo de inóculo en todo el centro de la botella plana. Con el micelio contenido en un tubo de cultivo se pueden inocular 10 botellas planas.
9. Correr un patrón de ambiente en una caja de petri, expuesta sin tapa durante 15' en el mesón de trabajo y mantener un control de medio de cultivo, que nos brinden información sobre la calidad de los ambientes y la efectividad de la esterilización.
10. Rotular el material con la fecha de la siembra, el tipo de medio de cultivo, la especie del hongo y la fuente del inóculo.
11. Recoger la basura del área de trabajo y limpiar y desinfectar después de la siembra y colocar trampas con formol comercial al 5% en volumen.
12. Colocar a incubar el material en un área oscura, cerrada y previamente desinfectada.
13. Evaluar diariamente el crecimiento micelial, retirar el material contaminado y eliminarlo siguiendo la metodología indicada en el presente protocolo para el material de desecho.
14. Cuando la invasión del micelio del hongo este entre el 90 y 100%, colocarle vinilpel a los tapones de algodón de las botellas planas, desinfectarlas y conservarlas en refrigeración entre 4 –6°C durante un tiempo no superior a los 3 meses.

## PRODUCCIÓN DE SEMILLA PRIMARIA

Una vez se tenga el medio de cultivo de las botellas planas invadido del micelio del hongo a cultivar, se inicia con la producción de la semilla primaria también conocida como cepa madre.

En la elaboración de ésta semilla se utilizan granos de cereales tales como el trigo, sorgo, cebada y millo. También se puede utilizar arroz y maíz triturado.



El primer paso en la elaboración de la semilla primaria consiste en lavar el grano del cereal lo suficiente para eliminar las impurezas, luego se someten a un proceso de hidratación con calor

Es importante resaltar que el porcentaje de humedad del grano afectará el crecimiento micelial. Si queda muy seco el desarrollo del micelio es lento y aumenta la posibilidad de contaminación por mohos y si la humedad es alta, las probabilidades de contaminación bacteriana aumenta.

Una vez que el grano hidratado alcanza la temperatura ambiente se envasa en frascos de conserva estériles y se somete a un proceso de esterilización.

Finalmente el material esterilizado se inocular con el micelio multiplicado en las botellas planas.

## PROTOCOLO

1. Cuantificar el número de frascos y botellas planas necesarias para la elaboración de la semilla.
2. Lavar y esterilizar el material de acuerdo a las metodologías básicas del laboratorio.
3. Limpiar y desinfectar el laboratorio y la cabina de flujo laminar o área de siembra según las metodologías básicas del laboratorio.
4. Mantener cerrada la puerta del laboratorio. Mantener una bata limpia y tapabocas al interior del laboratorio y una a la salida para el cambio.
5. Hidratar el grano de cereal de forma que se obtenga una humedad final aproximada entre el 38 y el 42%.
6. Pesarse el grano necesario, lavarlo con abundante agua hasta que quede limpio (aproximadamente 5 lavados), escurrir y adicionar al grano lavado 500 ml de agua/kg de grano seco y colocarlo a hidratar en una olla de fondo ancho.
7. Mantener el trigo al fuego hasta que se consuma el agua, revolviendo constantemente para evitar que se quemé.
8. Retirar la olla con el grano de cereal del fuego, una vez consumida el agua, y extender, para enfriarlo, en una superficie previamente desinfectada cubierta por plástico.
9. Revolver para homogenizar y empacar en frascos de vidrio de boca ancha, aproximadamente el 80% de su capacidad.
10. Tapar los frascos con una tapa metálica que tenga un agujero en la parte central tapado con algodón para facilitar el intercambio gaseoso durante la fase de incubación del hongo y envolver, el conjunto, en papel Kraft .
11. Esterilizar los frascos con el trigo a una temperatura de 121°C y dejar enfriar en una zona previamente desinfectada.
12. Retirar de la nevera las botellas planas que se utilizarán para la inoculación, 1 día antes de la siembra para permitir que el inóculo se aclimate.
13. Preparar los materiales para la siembra, desinfectar el área o cabina de flujo laminar y encender los mecheros.
14. Correr un patrón de ambiente para evaluar la calidad del proceso de desinfección y mantener un control de esterilización para determinar la calidad de la misma.

15. Retirar el papel Kraft de los frascos y junto a los mecheros dividir el agar de la botella plana en 8 pedazos con un asa espatulada, previamente flameada y enfriada (para inocular 8 frascos) de semilla primaria.
16. Cortar cada pedazo de agar, nuevamente, en 7 a 10 trozos y adicionarlos sobre el grano de cereal de los frascos y tapar el mismo.
17. Agitar el frasco, ya tapado, para favorecer la distribución de los trozos de agar-micelio en los granos de cereal.
18. Rotular los frascos con el nombre de la cepa, la fecha de inoculación y la fuente de inóculo.
19. Recoger la basura del área de trabajo y limpiar y desinfectar después de la siembra y colocar trampas con formol comercial al 5% en volumen.
20. Colocar a incubar los frascos en un área oscura, cerrada y previamente desinfectada.
21. Evaluar diariamente el crecimiento micelial de los frascos, retirando el material contaminado, el cual debe disponerse conforme a lo descrito en el presente documento para material de desecho.
22. Cuando la invasión micelial del hongo esté entre el 95 y 100%, colocarle vinilpel a los frascos, desinfectarlos y conservarlos en refrigeración (4 a 6°C) por un tiempo no superior a 1 mes.



Semilla primaria con invasión micelial completa

## PRODUCCIÓN DE SEMILLA COMERCIAL

Para la inoculación de los sustratos de cultivo se utiliza la semilla comercial, la cual se elabora a partir de la semilla cepa madre o inóculo primario.



Semilla comercial de hongos comestibles

La semilla comercial se prepara utilizando bolsas de polipropileno, resistentes a altas temperaturas.

Se recomienda utilizar bolsas con las siguientes dimensiones: 20cm de ancho x 50cm de largo y calibre 3, a las cuales se adiciona 1 Kg de grano de cereal hidratado, tal como se describió para la semilla inóculo primario.

Esta cantidad de material ocupa aproximadamente el 40% del volumen de la bolsa, permitiendo la formación de una cámara de aire, de aproximadamente el 60% de su capacidad restante, dado que en el extremo de la bolsa se coloca un aro o anillo de PVC de 3/4" y de 0.5 cm de longitud que sirve de sostén a un tapón de algodón que permite el intercambio gaseoso en el proceso de colonización del micelio sobre los granos de cereal.

Las bolsas con el cereal hidratado se esterilizan y se inoculan a una tasa del 10%, utilizando como inóculo la semilla cepa madre.

Cuando la invasión del micelio está entre el 95 y el 100% el material se refrigera, debiéndose utilizar máximo en los 15 días siguientes.

## PROTOCOLO

1. Cuantificar el número de bolsas necesarias, tapones de algodón, anillos de pvc y semilla cepa madre necesarios para la elaboración de la semilla comercial.
2. Lavar y desinfectar el material de acuerdo a lo expuesto en las metodologías básicas del laboratorio.
3. Desinfectar los anillos de PVC con jabón e hipoclorito al 2% y lavar con abundante agua. Colocar luego en un beaker y asperjar con alcohol y mantener así en el laboratorio hasta su uso. No esterilizar debido a la deformación que sufre el PVC a las temperaturas de esterilización.
4. Limpiar y desinfectar el laboratorio de acuerdo con las metodologías básicas del laboratorio.
5. Mantener cerrada la puerta del laboratorio. Mantener una bata limpia y tapabocas al interior del laboratorio y una a la salida para el cambio.
6. Hidratar el grano de cereal, de forma que se obtenga una humedad final aproximada entre el 38 y el 42%. Pesar el grano necesario, lavarlo con abundante agua hasta que quede limpio (5 lavados, aproximadamente), escurrir y adicionar al grano lavado 500 ml de agua/kg de grano seco y colocarlo a hidratar en una olla con fondo ancho hasta que se consuma el agua, revolviendo constantemente.
7. La olla con el grano hidratado se lleva al laboratorio y se extiende para enfriarlo en una superficie previamente desinfectada y cubierta por plástico, y se revuelve para darle homogeneidad. De esta forma se evita la condensación de agua dentro de las bolsas de polipropileno, lo que favorecería la aparición de bacterias.
8. Empacar el grano hidratado en bolsas de polipropileno, a razón de 1 kg/ bolsa y colocar en el extremo de las mismas un aro de PVC y un tapón de algodón.
9. Esterilizar en una autoclave a 121°C. Posteriormente, retirar el material del autoclave y enfriarlo en un sitio cerrado y previamente desinfectado.
10. La semilla cepa madre que se utilizará como inóculo debe retirarse de la nevera 1 día antes, para permitir su aclimatación.

11. Preparar los materiales para la siembra, desinfectar el área o cabina de flujo laminar y encender los mecheros.
12. Correr un patrón de ambiente para determinar la eficiencia de los procesos de desinfección.
13. Inocular la semilla comercial utilizando una cuchara estéril, previamente flameada en los mecheros.
15. Utilizar una tasa de inoculación del 7% (1 frasco de semilla cepa madre para 3 bolsas de semilla comercial).
16. Agitar la bolsa, ya puesto el tapón de algodón, para favorecer la distribución de los granos de cereal invadidos de micelio en los nuevos granos de cereal.
17. Rotular las bolsas con el nombre de la cepa, la fecha de inoculación y la fuente de inóculo.
18. Recoger la basura del área de trabajo y limpiar y desinfectar después de la siembra y colocar trampas con formol comercial al 5% en volumen.
19. Colocar a incubar las bolsas en un área oscura, cerrada y previamente desinfectada.
20. Evaluar diariamente el crecimiento micelial de las bolsas, retirando el material contaminado, el cual debe disponerse conforme a lo descrito en el presente documento para material de desecho.
21. Cuando la invasión micelial del hongo esté entre el 95 y 100%, colocarle vinilpel a los tapones de algodón, desinfectar las bolsas y conservarlas en refrigeración (4 a 6°C) por un tiempo no superior a 15 días.

## EQUIPOS DE LABORATORIO



### CABINA DE FLUJO LAMINAR

Equipo que proporciona un área de trabajo estéril para la preparación de medios de cultivo y siembra en los mismos, al contar con filtros HEPA y luz ultravioleta, que eliminan el 99.9% de los microorganismos presentes en el ambiente de la cabina.

### AUTOCLAVE

La esterilización en una autoclave se basa en la aplicación de temperatura y presión para eliminar los microorganismos y las esporas que se encuentren en el material. Este equipo utiliza sensores y alarmas que alertan los cambios del ciclo o anomalías en su funcionamiento.



### INCUBADORAS

Estos equipos que proporcionan a los cultivos la temperatura óptima de crecimiento y a su vez los protege de los contaminantes del ambiente externo.

### BAÑO DE MARÍA

Este equipo utiliza la técnica de baño de María y tiene control de temperatura y tiempo, que permite emplearse para la preparación de medios de cultivo y/o para la incubación de tubos de cultivos.



### DESTILADOR

Este equipo proporciona el agua destilada, ingrediente esencial en la preparación de medios de cultivo y en el análisis fisicoquímico de las muestras.



### PLANCHA CON AGITACION MAGNETICA

En la preparación de los medios de cultivo se puede emplear este equipo que proporciona temperatura y agitación magnética.

### BALANZA ANALÍTICA

La precisión en los pesos de los materiales es importante para la debida preparación de los medios de cultivo y el ahorro de los mismos.



### BALANZA HALÓGENA DE HUMEDAD

Esta balanza ofrece rapidez en la determinación de la humedad, la cual utiliza luz U.V que permite exactitud y agilidad en los muestreos.

## PROBLEMAS, CAUSAS Y SOLUCIONES

PROBLEMAS	CAUSAS	SOLUCIONES
Contaminación de la semilla con microorganismos competidores. (hongos y bacterias)	Acumulación de polvo y desinfección deficiente en el laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limpieza constante</li> <li>• Rotación de desinfectantes</li> </ul>
	Deficiencia en la esterilización del material	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavar y desinfectar correctamente el material.</li> <li>• Verificar temperaturas y tiempos de esterilización descritos en los protocolos</li> </ul>
	Fuente del inóculo contaminado	Seleccionar un inóculo de calidad, libre de contaminación y fresco.
	Humedad de la semilla en rango inadecuado.	Mantener la humedad del grano de cereal en el rango entre 38 y el 42%.
No se presenta crecimiento micelial en los granos de cereal	Presencia de fungicidas en el grano	Cambiar de proveedor
	Grano viejo y deteriorado	Seleccionar grano de calidad, que esté sano y libre de contaminantes e insectos.
	Humedades demasiado altas o demasiado bajas.	Mantener la humedad del grano de cereal en el rango entre 38 y 42%.
	Temperaturas inadecuadas de incubación	Mantener la temperatura de incubación en el rango entre 20 y 25 °C.

## LITERATURA CONSULTADA

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

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

**Producción de semilla comercial de  
hongos comestibles y medicinales**

Fotografía  
Archivo Cenicafé  
Archivo Proyecto

Diseño  
Martha Liliana Araque Fonseca  
Cenicafé  
Versión preliminar

Copyright © FNC -Cenicafé 2006

**CON EL APOYO DE:**

