

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



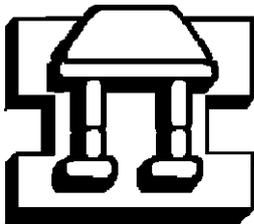
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA A PARTIR DE
INÓCULO DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer,
OBTENIDO EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS Y
LÍQUIDOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA:
Maribel Vega Ahedo

Director de tesis Biól. Víctor Manuel Esparza Martínez



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Enero, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible la conclusión de esta tesis.

A mi director de tesis. Biol. Víctor Manuel Esparza Martínez, a mis sinodales que aportaron sus ideas y recomendaciones para la culminación de este trabajo: Biól. Ma. Edith López Villafranco, Biól. Marcial García Pineda y en especial a M. en C. Ma. Irene Frutis Molina y al Biól. Luis Antonio Hernández González, que son dos magníficas personas que más que ser mis profesores en ellos encontré dos grandes amigos con una calidad humana inigualable gracias por el apoyo que me brindaron para la culminación de este proyecto. Los quiero, admiro y respeto, muchísimas gracias por estar siempre cuando los necesité.

DEDICATORIA

GRACIAS A DIOS POR PERMITIRME LLEGAR HASTA AQUÍ.

A mis padres y hermanas:

Porque me comprendieron al haber elegido mi camino. Porque con su, enseñanza, amor y confianza, fortalecieron mi vida. Porque siempre existieron palabras de apoyo que me ayudaron a seguir adelante. Porque con su esfuerzo y sacrificio logré el triunfo que hoy les brindo, con mucha admiración y respeto.

A mi esposo por:

Ser parte fundamental de mi vida, y ser esa otra a la que dios creo para mi, gracias por tu apoyo, comprensión y sobre todo tu amor.
Mi cielo te amo con todo mi corazón.

A mis sobrinos:

Gracias por ser mis angelitos que siempre están dispuestos a regalarme una sonrisa, un beso. Por enseñarme a quererlos como los quiero.

A mis amigos:

Claudia, Luís, Cristian, Liliana, Edith, Julio, Lupita, Marisol, Tomás, por regalarme uno de los tesoros más grandes de la vida, su amistad.

ÍNDICE

	PAG
Introducción:	7
Antecedentes	13
Objetivos y Justificación:	16
Material y Método:	17
• Etapa 1 :Aislamiento y purificación de un micelio a partir de la fructificación de una cepa HPC comercial de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr) Kummer.....	17
• Etapa 2:Propagación de la cepa HPC en los medios EMA variándolo con y sin sacarosa y PDA variándolo con y sin sacarosa, registrando el radio de la cobertura del crecimiento micelial.....	18
• Etapa 3:Propagación de la cepa HPC en medios líquidos malta, papa, y tres medios líquidos elaborados con harinas de maíz, trigo y arroz.....	19
• Etapa 4:Elaboración de semilla en cereal sorgo (inoculo) con la cepa obtenida.....	21
• Etapa 5: Se llevo a la producción el micelio en semilla cereal sorgo testigo y el micelio obtenido en los medios líquidos experimentales maíz, trigo, arroz, malta, papa en substrato pajo de trigo.....	23

• Etapa 6: Evaluación de la eficiencia biológica de los tratamientos.....	25
• Etapa 7: Análisis estadístico	26
Resultados y Discusión:	27
• Etapa 1 :Aislamiento y purificación de un micelio a partir de la fructificación de una cepa HPC comercial de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr)Kummer.....	27
• Etapa 2:Propagación de la cepa HPC en los medios EMA variándolo con y sin sacarosa y PDA variándolo con y sin sacarosa, registrando el radio de la cobertura del crecimiento.....	28
• Etapa 3:Propagación de la cepa en medios líquidos malta, papa, y tres medios líquidos elaborados con harinas de maíz, trigo y arroz.....	30
• Etapa 6: Evaluación de la eficiencia biológica de los tratamientos.....	32
Conclusiones:	35
Referencias:	36
Anexo:	37

INTRODUCCION

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de 200 años en Europa con el cultivo del champiñón *Agaricus bisporus* y en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edodes* y *Auricularia spp.* Esta tecnología llegó al nuevo mundo hacia finales del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX de una manera muy discreta. No fue sino hacia la segunda mitad de este siglo, gracias al mejoramiento de las técnicas existentes, que la industria se hizo presente de una manera importante en varios países de América. Después de los años 70' debido a la necesidad de desarrollar fuentes no convencionales de alimentos y de optimizar los recursos disponibles, así como gracias al aprovechamiento de técnicas para el cultivo comercial de otras especies, se dio de manera creciente el interés por cultivar este tipo de hongos. Tal interés encontró un eco importante con el florecimiento a nivel mundial de una cultura ecológica ávida de tecnologías “ambientalmente seguras” y el avance de la agricultura orgánica. Ante esta situación, poco a poco se va conformando una conciencia ambientalista mundial en la cual el cultivo de hongos encaja perfectamente bien. (Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

En México muchas especies de hongos han sido reportadas como comestibles y algunas de ellas se consumen desde tiempos prehispánicos. Los hongos conocidos entre los aztecas como nanacatl, vocablo que significa “carne”, dieron además nombre a algunos lugares como Nanacatepec (el cerro de los hongos) Nanacamilpa (lugar donde crecen los hongos), mostrando así la importancia de estos organismos en la vida cotidiana. Otro aspecto interesante en el conocimiento tradicional de los hongos es la gran cantidad de nombres vernáculos que existen en América Latina. Para el caso concreto de las especies comestibles, se han registrado más de 2 mil nombres comunes. (Gaitán *et al.*, 2006).

Esta tecnología llegó a México 1931 con la llegada de José Leben Zdravie , proveniente de Trieste Italia; ya instalado en el país, un amigo y paisano, que había visto como se cultivaba el champiñón en Europa, estimuló a Leben para llevarlo a cabo. Sin contar con capital disponible, en 1933 Leben inicio los primeros ensayos del cultivo del champiñón en México en el rancho grande de Tulipa, cercano a Texcoco (Martínez-Carrera *et al.*, 1991).

El cultivo de *Pleurotus spp.* Pertenece al siglo XX. A pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un desarrollo rápido, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer,

permite apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios (Martínez-Carrera, 2004). Su caso merece una atención especial: mas que cualquier otro de los géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer, con un amplio rango de temperaturas, una calidad organoléptica excelente (Sánchez et al., 2002).

El cultivo de *P. ostreatus* en México inició en 1974 en la población de Cuajimalpa (Martínez-Carrera et al, 1991). Actualmente, debido a diversas investigaciones y adaptaciones tecnológicas desarrolladas, el interés por cultivarlo se ha difundido en todos los ámbitos del país. Esto ha dado lugar a un innumerable grupo de pequeñas iniciativas de producción a baja escala, aún de economía familiar, las cuales comercializan el producto en fresco. Según Martínez con este cultivo se observan dos tipos de tecnologías: una de tipo industrial que requiere de un composteo aerobio con pasteurización por vapor en túnel; y otra más rústica, que se utiliza en pequeñas plantas de tipo familiar. Esta última, de producción limitada y no contabilizada en la economía regional, emplea la inmersión del sustrato en agua alcalina fría o en agua caliente para la eliminación de la microbiota concurrente. La mayoría de las empresas que usan esta tecnología enfrentan muchas dificultades tanto técnicas como financieras en su operación. (Martínez-Carrera et al., 1991).

Durante el periodo 1990-1997 se observó en México un incremento en la producción de dicha especie superior al 400%. En este último año se estimó una producción de 1825 toneladas, lo cual significó un nivel de producción comercial de unas 5 ton/día. (Martínez-Carrera, 1997; Leal-Lara, 1998). Por esta razón se ha considerado a México como el principal productor de América (Cuadro 1).

Cuadro 1. Producción estimada (peso fresco) de <i>Pleurotus spp.</i> En algunos países de América Latina	
País	Toneladas %•
México	1,182,547.53
Estados Unidos	290,823.65
Canadá	356,814.79
Brasil	445,011.72
Guatemala	5,220.57
Venezuela	6,180.47

Cuba	7,120.31
Colombia	890.23
Otros	280.73
Total (Amer)	3,846,100.00

Fuente: (Sánchez., et al 2002).

Este incremento quizá se deba a que actualmente el hongo seta (*Pleurotus spp*) se ha considerado un complemento alimenticio de un aceptable valor nutricional, ya que sus proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales, por lo que debe ser incluido en la dieta diaria. Este hongo es rico en carbohidratos, vitaminas, fibra y minerales, además de que posee un bajo contenido de grasas. Presenta entre el 57 y 61 % de carbohidratos en base a su peso seco, 26 % de proteínas y un contenido de fibra del 11.9 %. Contiene vitaminas como la niacina, tiamina (vitamina B1), vitamina B12 y la vitamina C o ácido ascórbico. Además se le han detectado minerales como el potasio, fósforo, calcio, entre otros. Su contenido de grasa es de 0.9 a 1.8 % con base a su peso seco y su valor nutricional en relación con otros alimentos se puede observar en la figura 1. (Gaitán et al. ,2006).

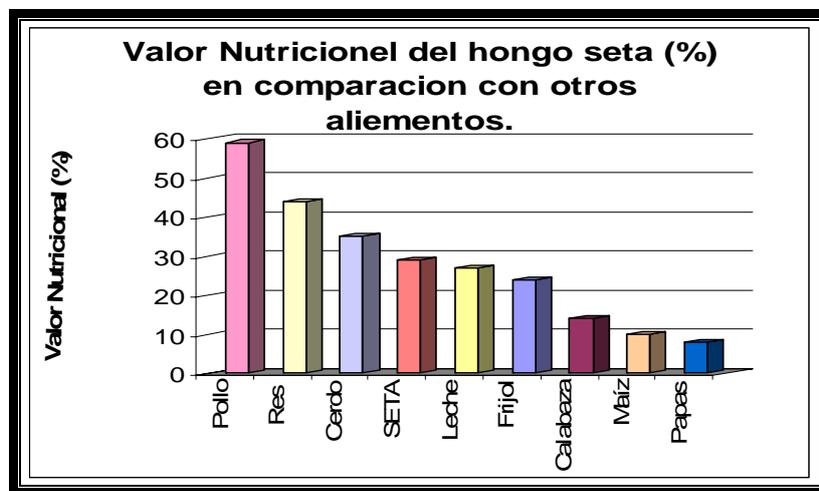


Fig 1. Valor nutricional de hongo seta (%) en comparación con otros (Gaitán., et al 2006).

Estos organismos se ubican en el Reino Fungí, Phylum Basidiomycota, Orden Agaricales, Familia Tricomateace, Genero *Pleurotus* (Alexopullus 1996).

En general cada hongo esta formado por una serie de finos filamentos llamados hifas, que en conjunto forma lo que se denomina micelio. En la naturaleza y bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, este micelio extendido sobre un sustrato adecuado se trasforma en pequeños grumos que van aumentando de tamaño hasta formar la típica seta. (Gaitán., et al 2006);

El hongo formado presenta un sombrero o píleo convexo, raramente redondeado, casi siempre en forma de ostra o concha, puede presentar escamas hacia el centro o en la base, puede medir entre 5 y 12 cm de diámetro, su color es muy variable, negro violáceo, pardo ceniciento gris, amarillo, blanco, rosa según la especie. Sus laminas son muy recurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillas. El estípite es corto, excéntrico o lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del sombrero o píleo, algunas veces no se presenta. Generalmente mide alrededor de 2 cm de largo, 1-2 cm de grosor, y es blanquecino y de contexto blanco. Las esporas son de color lila o crema en masa, elipsoide con una talla promedio de 9.5 x3.5 micras (Sánchez., et al 2002).

El PIE, tiene la función de producir las estructuras de reproducción llamadas esporas cuya misión es perpetuar la especie. Estas esporas se forman en la cara inferior del sombrero, en unas laminillas verticales que se extienden desde la parte superior del estípite hasta el borde del sombrero. Un hongo o cuerpo fructífero representa para el micelio lo que un fruto para un árbol (Gaitán., et al 2006).

Los hongos en general son conocidos por su forma de paraguas, con un sombrero más o menos circular y un eje o pie que lo sostiene, pero para el caso de la seta este pie es más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, de hecho a este hongo técnicamente se le llama *Pleurotus*, término que deriva del griego pleura o pleurón costado o lado y del latín otus, oreja (Fig.2). (Gaitán., et al 2006).

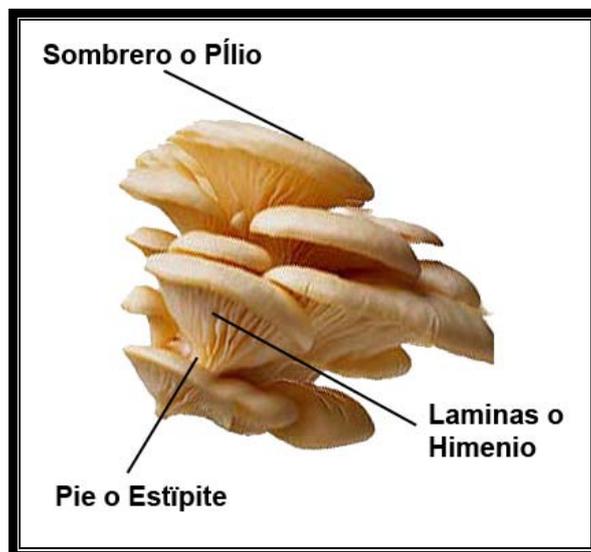


Fig 2. Seta con sus partes principales.

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 es importante el suministrar un sustrato adecuado al hongo cuando se le intenta cultivar para los nutrientes puedan ser aprovechados por las hifas del micelio. Para que la seta se desarrolle adecuadamente se requiere de una temperatura y humedad adecuada, así como aire que aporte oxígeno y cierta cantidad de luz. Con estos factores se deducen las necesidades que tiene que satisfacer el cultivo de hongos seta. El conocer el desarrollo de un hongo en la naturaleza y entender su ciclo de vida (Fig 3.), nos dará el conocimiento para poder manipularlo y producirlo en condiciones artificiales de cultivo. (Gaitán., et al 2006).

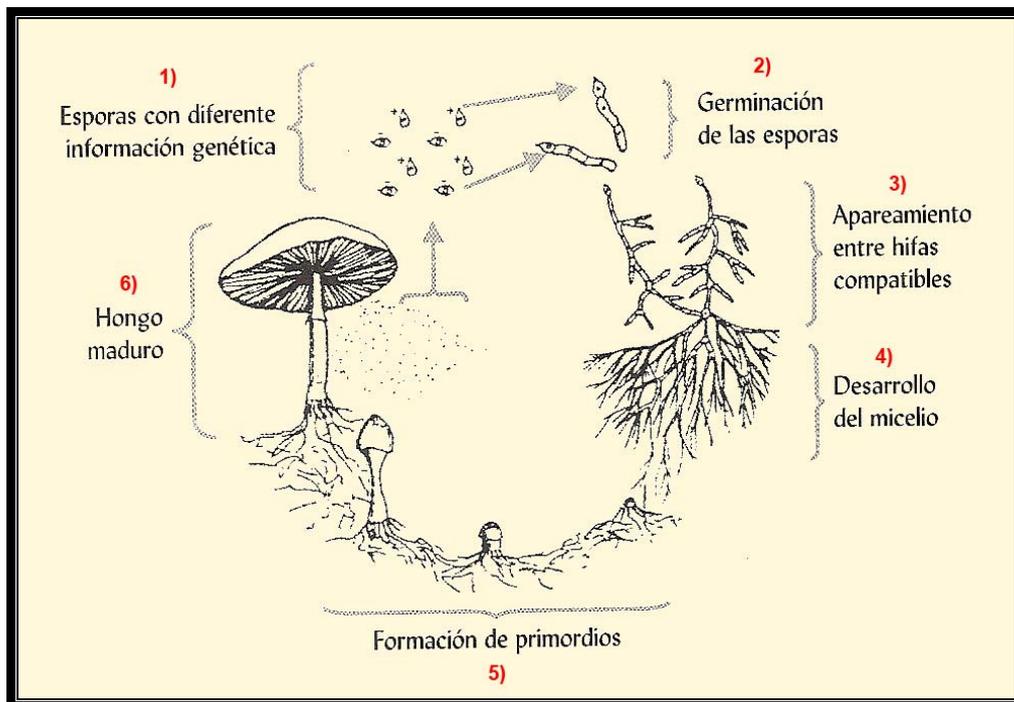


Fig.3 Ciclo de Vida del hongo seta: 1) Esporas con diferente información genética, 2) Germinación de las esporas, 3) Apareamiento entre hifas compatibles, 4) Desarrollo del micelio, 5) Formación de primordios, 6) Hongo maduro.

RESUMEN

Para que el cultivo de algunas especies de hongos comestibles se pueda incrementar, es necesario superar algunos puntos críticos entre los que destacan la obtención de micelio. En la actualidad los trabajos que se realizan en un laboratorio de inóculo mantienen un control riguroso en los procesos los cuales utilizan equipo de primera línea.

Por lo anterior el presente trabajo da a conocer una nueva alternativa para los productores de semilla, en un medio de cultivo a muy bajo costo. El presente estudio evaluó medios de cultivo, sólidos EMA con y sin azúcar (sacarosa); y PDA con y sin azúcar (sacarosa); al ser aplicado el análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$) y LDS, en los promedios del radio de la cobertura del crecimiento micelial, los resultados nos muestran un mayor crecimiento micelial en los medios PDA y PDA con sacarosa con respecto a los medios EMA y EMA con sacarosa. Para los medios líquidos, fueron 3 experimentales de diferentes harinas: maíz, trigo y arroz (experimentales) y 2 testigos Malta y Papa (tradicionales) se evaluó su biomasa micelial (peso seco). Al aplicarse el análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$) se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos tradicionales y experimentales. Se llevo a producción el micelio obtenido de los tratamientos líquidos (maíz, trigo, arroz, papa) y en semilla tradicionalmente utilizada, en paja de trigo, se evaluó su eficiencia biológica, al aplicarle el análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$) y el LSD se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

A N T E C E D E N T E S

Man-Tawia., 1987 Evaluaron los requerimientos nutricionales de P, K, Mg, Mn para el crecimiento micelial del hongo *Pleurotus ostreatus* (Jacq-ex Fr.) Kummer, estos nutrientes fueron conducidos en cultivo sumergido usados un medio sintético y uno basado en extracto de musgos. Encontraron que el P y K con el sulfato de potasio si se suplementa al extracto de musgo estos favorecen el crecimiento micelial, produciendo una mayor concentración de biomasa seca.

Ayala., 1991 Utilizaron medios adecuados para el crecimiento de este género como agar Saboraud dextrosa, agar papa dextrosa agar extracto de malta y bactoagar, suplementando este ultimo con extracto de ejote, resulto ser el más rápido en el crecimiento.

Rodríguez., 1992 Estudio el comportamiento de tres cepas *Pleurotus spp* sobre tres medios de cultivo sólidos a nivel laboratorio, agar con extracto de malta (EMA) agar con dextrosa y papa (PDA) y agar con harina de trigo integral (HIT) bajo condiciones totalmente de oscuridad. Demostrando que no existe diferencia en cuanto al crecimiento micelial.

Cruz., 1996 Utilizo medios de cultivo suplementarios para la producción de micelio de *Pleurotus ostreatus* (Jacq-ex Fr.). Resultando que los medios de cultivo aguamiel, agua de coco, miel de abeja, son competitivos y mejores que PDA comercial para la producción de micelio.

Ramos., 1996 Evaluó la obtención y caracterización de cepa de *Pleurotus spp* omitiendo el medio de cultivo sintético; propone inocular directamente las esporas suspendidas con agua al sorgo, sin utilizar los medios sólidos para obtener la cepa sino directamente coloca las esporas al sorgo, así obtuvo el micelio de *Pleurotus spp*.

López *et al.*, 1997 Evaluaron el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* (Jacq-ex Fr.) Kummer y *Auricularia fuscusuccinea* en medios líquidos elaborados con: agua de maíz, extracto líquido de pulpa de café, agua de granos de café, infusión de sorgo, suero de queso y extracto de levadura con glucosa. El mejor crecimiento de ambas especies lo registraron en el extracto de levadura con glucosa produciendo 3.9 y 3.78 g/l de biomasa respectivamente, después de 168 hrs. en cultivo en frascos, el mejor medio para *Pleurotus ostreatus* fue el suero de queso, mientras que para *Auricularia fuscusuccinea*, fue el de agua con granos de café.

Guillén-Navarro *et al.*, 1998 Demuestran que los cultivos sumergidos en medios sintéticos con extracto de levadura a distintas concentraciones de glucosa (0, 5,20 g/l), diferentes pH (3, 5, 6.5) se pueden utilizar para preparar mayor cantidad de inóculo de un tamaño homogéneo y que al sembrarse en medios sólidos crezca rápidamente. Además el medio extracelular puede utilizarse para obtener enzimas como un producto de alto valor agregado; las mejores condiciones de cultivo fueron de 5.5 – 6.5.

Escobar *et al.*, 2002 Evaluaron el crecimiento micelial y viabilidad de *Pleurotus ostreatus* (Jacq-ex Fr.) Kummer y *Auricularia* en tres medios líquidos: carbón /2 g/l), nitrógeno (2.4mM), abundante carbono y nitrógeno (10 g/l y 24 mM) a los cuales los mantuvieron en agitación. , al segundo día de crecimiento micelial se les adiciono 0.5 ml de endosulfato, hasta ajustarle una concentración de 10 partes por millón., analizaron la producción de azúcar y endosulfato los 2, 8, 14,17 días, reportaron que estos hongos fueron aptos al crecimiento.

Aguilar *et al.*, 2006 Compararon el crecimiento de diferentes cepas del genero *Pleurotus*, para el crecimiento en medios líquidos las cepas ECS127R, RP, y PCM estas se hicieron crecer en una solución de extracto de malta y sacarosa, para las placas de agar el extracto de malta RP, IE202, ECS127 y PCM observaron que la cepa RP, IE200 y PCM presentaron mayor crecimiento micelial en cajas petri. Para los medios líquidos la cepa PCM obtuvo una menor producción de biomasa micelial, mientras que la cepa IE200 Y ECS127 Originaron una mayor cantidad de biomasa las cuales se les considera buenas para la producción de micelio en los medios líquidos.

OBJETIVOS y JUSTIFICACION

Objetivo General:

Evaluar la eficiencia biológica de inóculo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer a partir de distintos medios de cultivo sólidos y líquidos.

Objetivos Particulares:

Comparar el crecimiento micelial de la cepa HPC en los medios EMA con y sin sacarosa y PDA con y sin sacarosa.

Evaluar el crecimiento micelial de la cepa HPC en medios líquidos malta, papa y tres medios líquidos elaborados con harinas de arroz, maíz y trigo.

Elaborar semilla en el cereal (sorgo).

Comparar la producción de biomasa micelial en medio elaborado con cereal (sorgo) y los medios líquidos (malta, papa, maíz, trigo y arroz) en sustrato paja de trigo y medir su eficiencia biológica.

Justificación:

Por lo anterior *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer es una especie susceptible de cultivo a escala industrial. Sin embargo para que su explotación se haga extensa es necesario superar algunos puntos críticos entre los que destacan la obtención de inóculo (semilla o Micelio), para ello es necesario crear nuevas alternativas en la creación de medios de cultivo que permitan obtener micelio, a bajo costo y en el menor tiempo posible.

MATERIAL Y METODO

El método consiste de seis etapas como se muestra mas adelante.

Etapa 1:

Aislamiento y purificación de un micelio a partir de la fructificación de la cepa comercial HPC de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer.

Se eligió un hongo en buen estado, fresco, turgente joven, compacto, limpio; olor a hongo sin exceso de humedad: De la cosecha de cultivo de la FES, Iztacala UNAM.

El hongo se dejó dentro de la campana de siembra microbiológica limpia y desinfectada durante 24 horas para desecarlo un poco, al término de este tiempo se colocaron también dentro de la campana las cajas de petri con el medio EMA (5 cajas) después de la prueba de esterilidad de 3 días, se generó el campo estéril y se procedió a inocular en las cajas, un pequeño fragmento del contexto del cuerpo fructífero, las cajas se sellaron, rotularon y se incubaron a una temperatura de 18 a 28 °C.



Fig 4. Aislamiento y purificación de un micelio de la cepa HPC a partir de la fructificación de la cosecha de cultivo de la FES, Iztacala UNAM.

Etapa 2:

Propagación de la cepa HPC en los medios EMA variándolo con y sin sacarosa y PDA variándolo con y sin sacarosa, registrando el radio de la cobertura del crecimiento.

Para los medios sólidos se realizaron cuatro tratamientos con cinco repeticiones, dos testigos; 1(Extracto de Malta Agar), 2(Papa Dextrosa Agar), y dos experimentales; 1(Extracto de Malta

Agar suplementado con sacarosa) ,(Papa Dextrosa Agar suplementado con sacarosa), el cuadro 2, muestra la composición de los medios de cultivo utilizados en esta investigación. A los cuales se les inoculo una muestra de 1cm de la cepa obtenida, se sellaron y rotularon incubándolas a una temperatura de 18 a 28°C en oscuridad.

Para registrar el radio de la cobertura del crecimiento fue necesario trazar una circunferencia en una hoja albanene, la cual se dividió con tres líneas, entre ellas la separaba un ángulo de 120°; esta hoja se colocaba en cima de cada caja petri (cada caja estaba dividida por tres puntos de 120° de separación entre ellos.); cada línea de esta hoja tenia que coincidir con cada punto, con ayuda de una regla se media el crecimiento lateral a partir del 2° día hasta el 13°, donde se cubrieron completamente. Así se obtuvo el promedio, al cual se le aplico las pruebas estadísticas ANOVA y LSD.

Cuadro 2. Muestra la composición de los medios sólidos en gr de los cuatro tratamientos.					
MEDIOS SÓLIDOS					
EXPERIMENTALES	Unidades	Extracto malta agar	Papa Dextrosa Agar	Suplemento sacarosa	Agua Destilada
Testigo 1	(5cajas)	4.57gr		----	125ml
Testigo 2	(5cajas)		4.87gr	----	125ml
Experimento 1	(5cajas)	4.57gr	-----	.87gr	125ml
Experimento 2	(5cajas)	----	4.87gr	.87gr	125ml

Etapa 3:

Propagación de la cepa HPC en medios líquidos malta, papa, y tres medios líquidos elaborados con harinas de maíz, trigo y arroz.

Para los medios líquidos se prepararon 5 tratamientos con 10 repeticiones dos testigos, malta y papa y tres experimentales, maíz, trigo, arroz. Como se muestra en el cuadro 3 muestra la composición de los medios de cultivo utilizados en esta investigación.

De la cepa HPC obtenida se extrajeron fragmentos con un saca-bocados con un diámetro de 1 cm previamente esterilizado, colocándolos inmediatamente en los frascos, se incubaron a una temperatura de 18 a 28°C, en oscuridad. Al término de 30 días el micelio desarrollado en estos medios, se obtuvo por filtración, el cual consistió en vaciar los medios con el micelio desarrollado, en un filtro, los cuales se deshidrataron en horno a una temperatura de 60°C obteniendo su peso seco de la biomasa micelial, al cual se le aplicó la técnica estadística ANOVA.

Cuadro 3- Muestra la composición de los medios líquidos en gr de los cinco tratamientos.										
MEDIOS LÍQUIDOS										
	Unidades	Malta	Papa	Dextrosa	Leche	Azúcar	Harina de Maíz	Harina de Trigo	Harina de Arroz	Agua Destilada
Testigo 1	10 Frascos	22.5gr	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	250mil
Testigo 2	10 Frascos	-----	300gr	30gr	-----	-----	-----	-----	-----	250 mil
Experimental 1	10 Frascos	-----	-----	-----	.9gr	1.5gr	3gr	-----	-----	250 mil
Experimental 2	10 Frascos	-----	-----	-----	.9gr	1.5gr	-----	3gr	-----	250 mil
Experimental 3	10 Frascos	-----	-----	-----	.9gr	1.5gr	-----	-----	3gr	250mil

Nuevamente se prepararon 5 tratamientos pero en esta ocasión solamente al 20% con respecto a las concentraciones de la composición de los medios líquidos del cuadro 3, al término de 31 días estos se inocularon en sustrato paja para su fructificación.



Fig5. Crecimiento micelial en los medios líquidos (maíz, trigo, arroz, papa y malta).

Etapa 4:

Elaboración de semilla en cereal sorgo (inoculo) con la cepa HPC obtenida.

Para la preparación de inoculo en semilla se utilizo sorgo. Este se limpió mediante enjuagues con abundante agua, posteriormente se dejo remojar con agua clorada durante 24 hrs.; transcurrido el tiempo este se escurrió, y se envasó en frascos de vidrio con capacidad de 500 gr, agregándole 250 gr del cereal. Estas se esterilizaron en una olla de presión con un tiempo de 45 min. Transcurrido el tiempo se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente; una vez frío el cereal de estos frascos, se agitaron vigorosamente, para una mejor homogeneidad, aireación para oxigenarlo, manteniendo la asepsia adecuada.

Dentro de la campana de siembra se inoculo con ayuda de un saca bocado, previamente esterilizado se tomaron pequeños fragmentos los cuales se depositaron homogéneamente dentro de cada uno de los frascos. Al término de la inoculación se incubaron a una temperatura de 28° a 30°C en oscuridad hasta que el micelio invadió totalmente el cereal a estos frascos se les llama “frascos primarios” (figura 6), (Guzmán 1993)



Fig 6. Producción de “inoculo primario” en sorgo.

Estos frascos fueron productores de más micelio, el cual fue utilizado para inocular bolsa de polipapel que dan como resultado una siguiente generación micelial, al cual se le conoce como “Bolsas Secundarias”, (figura 7) a estas se les proporciono las mismas condiciones que a los anteriores (frascos primarias) solo que el micelio que se les inoculo se obtuvo de dichas frascos, estas segundas bolsas se incubaron a una temperatura de 28 a 30°C en oscuridad.



Fig 7. Producción de inoculo secundario a partir del inoculo primario.

Para la obtención de las “bolsas terciarias” se prepararon bolsas con las mismas condiciones, solo que para la inoculación, se utilizó micelio de las “Bolsas Secundarias”, estas segundas bolsas se incubaron a una temperatura de 28 a 30°C en oscuridad. Estos procesos tuvieron un tiempo de incubación de 15 a 20 días.



Fig 8. Se observa el inoculo en semilla de sorgo.

Etapa 5:

Se llevo a la producción el micelio en semilla de sorgo testigo y el micelio obtenido en los medios líquidos experimentales maíz, trigo, arroz, malta, papa en sustrato paja de trigo.

Finalmente el micelio obtenido en sorgo, semilla terciaria y líquida (malta, papa, maíz, trigo y arroz) se sembró, en paja de trigo (1paca) la cual se introdujo en un tinaco de aluminio de 200 lts. Se lleno con agua hasta el borde y se tapo se dejo remojar 24 horas, para su hidratación. Trascurrido el tiempo se le aplico calor, cuando alcanzo una temperatura de 70°C, esta se

mantuvo por un lapso de 2:00 hrs., concluido el tiempo se retiro el calor. Como se observa en la figura 9.



Fig 9. Se observa la pasterización del sustrato paja de trigo.

Con el sustrato ya listo se prepararon 60 bolsas con 500gr, para las 10 primeras bolsas testigo, les fue colocando una cama de sustrato, un poco de semilla por la periferia hasta inocular 12.5 gr de semilla por 500gr de paja de trigo, se sellaron y rotularon como se observa en la figura 10.

Las siguientes 50 bolsas experimentales, se les inoculo el micelio obtenido de los medios líquidos maíz, trigo, arroz, malta, papa, el micelio les fue inoculado cuando las bolsas, tenían una cama de sustrato de 250 gr, el micelio se coloco aleatoriamente sobre la periferia, este micelio se fragmento manualmente, posteriormente se siguió acomodando el sustrato hasta que obtuvieran el peso de 500 gr cada una, se sellaron y rotularon como se observa en la figura 10.



Fig 10. Elaboración de bolsas con sustrato paja de tigo.

Al termino de la inoculación inmediatamente se trasladaron a la área de incubación, esta se encuentra en oscuridad a una temperatura de 18 a 28 °C con ventilación y temperatura adecuada; Al día siguiente se les hicieron unos pequeños orificios, por la parte de abajo, permitiéndole así eliminar el exceso de agua.

Al cuarto día las bolsas en forma aséptica, se les realizo perforaciones aleatoriamente con ayuda de un tenedor previamente esterilizado, permitiendo el intercambio gaseoso, revisándolas diariamente.

Cuando aparecieron los primordios sobre el sustrato, se les retiro la bolsa de plástico para evitar deformaciones de los carpóforos, y para permitir su total desarrollo así como el riego del sustrato las cuales se trasladaron y colocaron en la base de soporte de la zona de Fructificación esta se mantuvo con luz tenue, humedad de 60 a 80 %, con una buena ventilación y una temperatura de 18 a 28 °C. Se midió diariamente temperatura máxima, humedad relativa las cuales se regularon por medio de riego sobre las paredes y suelo de esta área de fructificación.



Fig 11. Fructificación.

Etapa 6:

Evaluación de la eficiencia biológica de los tratamientos:

Para la evaluación de la eficiencia biológica por bolsa de sustrato. Los carpóforos una vez ya maduros, se cosecharon y se separaron. Se evaluó el rendimiento total, en el cual se obtuvo de la primera cosecha la bolsa de sustrato de cada tratamiento.

Para expresar el porcentaje y realizar la evaluación de la producción, se empleó la fórmula de eficiencia biológica propuesta por Tchierpe y Hartman 1977 citado por Rodríguez 1992.

$$\text{Ef.B} = \text{Peso húmedo del hongo} / \text{Peso seco del sustrato} \times 100$$

Etapa 7:

Análisis estadístico.

Para la evaluación de los resultados, una vez obtenidos se calculó la Media, Desviación Estándar, la prueba estadística análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$), permitiéndonos observar si existe diferencia entre lo analizado, a estas diferencias se les aplicó la prueba estadística LSD, la cual nos permite identificar en donde existen las diferencias (Duran *et al* 2006).

RESULTADOS Y DISCUSION

Etapa 1:

Aislamiento y purificación de micelio a partir de la fructificación de una cepa HPC comercial de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kummer.

Para la obtención de la cepa HPC, se inoculo un pequeño fragmento del contexto del cuerpo fructífero en 5 cajas petri con medio EMA, presentando un crecimiento promedio diario de 2 mm, al término de 17 días se obtuvo el crecimiento total del micelio de la cepa obtenida.

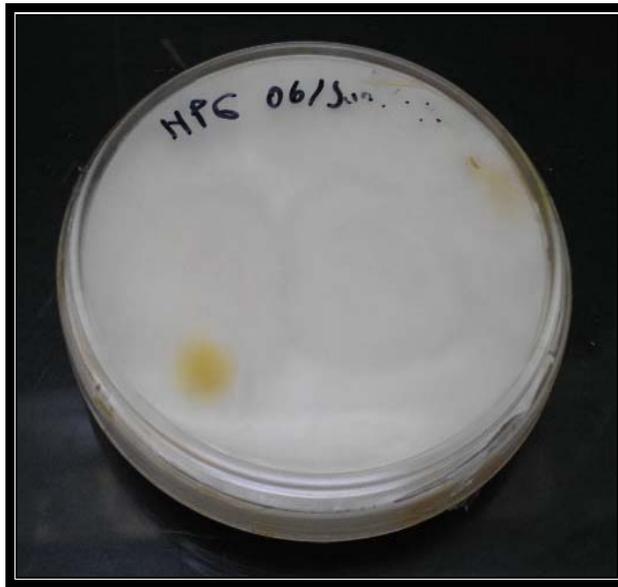


Figura 12.- Crecimiento micelial de la cepa obtenida del aislamiento de la cepa HPC

Etapa 2:

Propagación de la cepa HPC en los medios EMA variándolo con y sin sacarosa y PDA variándolo con y sin sacarosa, registrando el radio de la cobertura del crecimiento.

Se obtuvo la Media y Desviación Estándar, del radio de la cobertura del crecimiento micelial de la cepa HPC (Cuadro 4), para su análisis se les aplicó las pruebas estadísticas análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$), (Cuadro 5) y el LSD como se observa en la figura 13., los resultados nos muestran que existe un mayor crecimiento micelial de los medios PDA y PDA + sacarosa, con respecto al micelio crecido en los medios EMA y EMA + sacarosa.

Cuadro 4. Media y Desviación Estándar del Radio de la Cobertura Micelial de los Medios Sólidos.				
Tratamientos	Radio de la Cobertura Micelial			
	X	±	SD	
EMA + SACAROSA	1.839	±	0.067	b
EMA	2.113	±	0.058	b
PDA + SACAROSA	3.112	±	0.297	a
PDA	3.153	±	0.334	a

Los valores son significativamente diferentes de acuerdo con las medias a y b ANOVA ($p > 0.05$).

Cuadro 5. ANOVA de un factor del radio de la cobertura del crecimiento micelial de los medios sólidos.			
Origen de las variaciones	Grados de libertad	F	Valor crítico para F
Entre grupos	3	12.595	3.238
Dentro de los grupos	16		
Total	19		

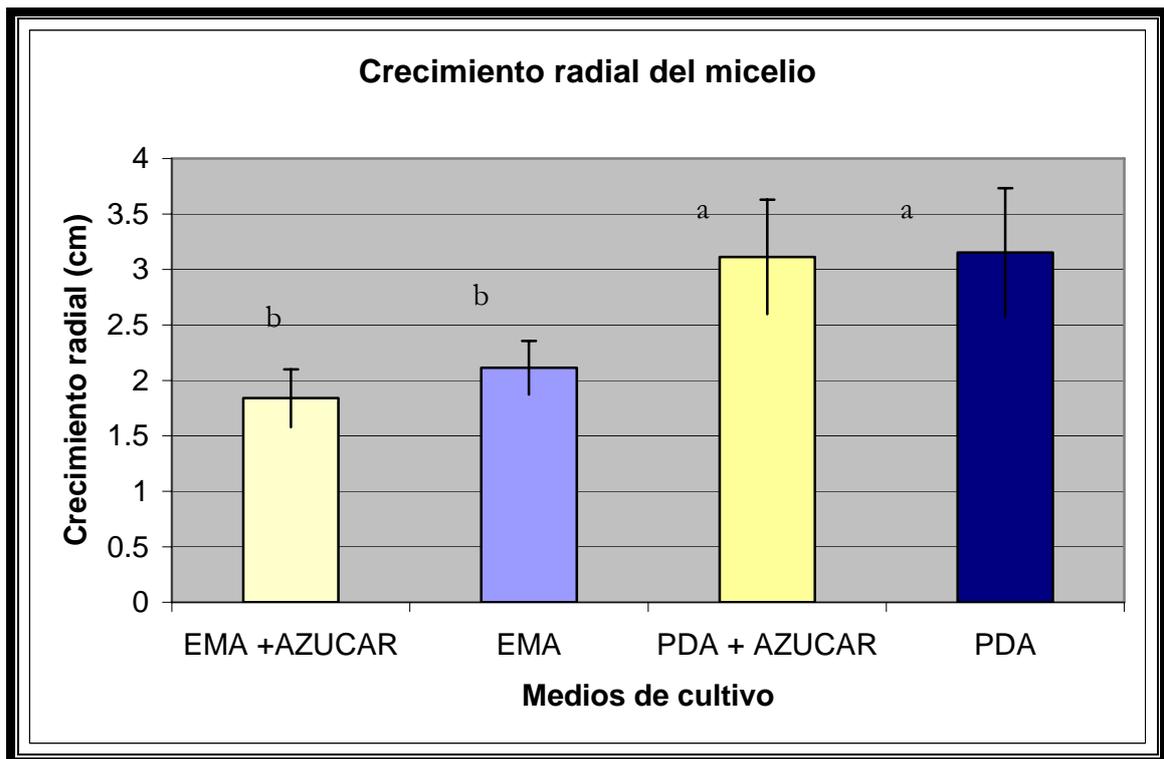


Fig 13. Muestra los promedios del crecimiento micelial de los 4 medios sólidos.

En base a lo anterior el presente trabajo nos permiten observar que los tratamientos EMA y EMA + Sacarosa, presentan un menor crecimiento micelial para esta cepa, a pesar de que diversos autores como Martínez, en 1984, Acosta, *et al* .1988, Cedano, *et al* 1989 y Hernández 1994, citados por Rodríguez en 1992; reportan que el medio EMA es el más apropiado para el desarrollo micelial de algunas cepas de las especies de *Pleurotus sp*; para este trabajo la cepa HPC presenta una preferencia por los tratamientos PDA y PDA + sacarosa mostrando un mayor crecimiento micelial y uniforme.

La suplementación con sacarosa para los medios EMA y PDA no favoreció al crecimiento micelial como se observa en la figura 12. En contraste con la suplementación con diferentes componentes como el aguamiel, la harina de trigo, el azúcar, reportados por Cruz, 1996, Rodríguez, 1992. Ayala, 1991 estas suplementaciones favorecen exitosamente en el crecimiento micelial en las cepas que utilizaron.

Etapa 3:

Propagación de la cepa HPC en medios líquidos malta, papa, y tres medios líquidos elaborados con harinas de maíz, trigo y arroz.

Se obtuvo el peso seco de la biomasa micelial de los medios líquidos por el método empleado. Los resultados fueron procesados mediante el cálculo de la Media y la Desviación Estándar (Cuadro 6) y evaluados con las pruebas estadísticas análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$), (Cuadro 7) este estadístico muestra que no existe diferencia entre el crecimiento micelial de esta cepa en los diferentes tratamientos a pesar de su composición.

Cuadro 6. Biomasa del Peso Seco del Micelio de los Medios Líquidos.			
Tratamientos	Biomasa del Peso Seco		
	X	±	SD
MAIZ	0.5325	±	0.061
TRIGO	0.438	±	0.019
ARROZ	0.544	±	0.029
PAPA	0.411	±	0.092
MALTA	0.663	±	0.06

Los valores no presentan diferencias significativas de acuerdo a sus medias ANOVA ($p > 0.05$).

Cuadro 7. ANOVA de un factor de la biomasa de peso seco del micelio de los medios sólidos.				
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Grados de libertad	F	Valor crítico para F
Entre grupos	4	5	1.646	2.612
Dentro de los grupos	39	40		
Total	43	44		

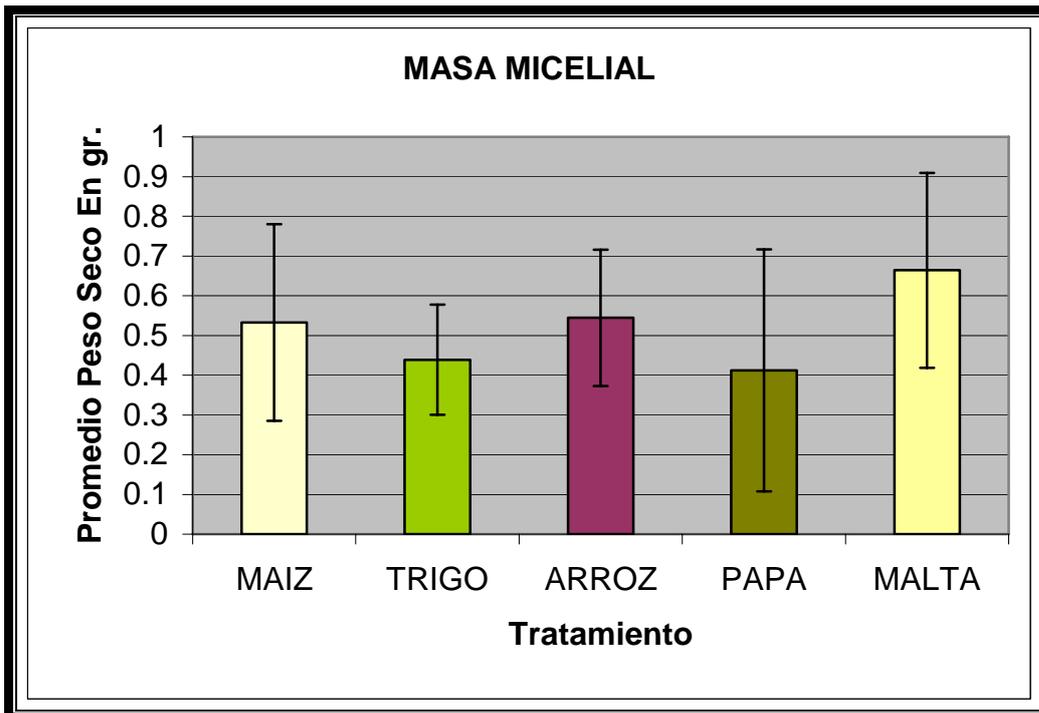


Fig 14. Muestra los promedios del peso seco del micelio obtenido en los 5 medios líquidos.

Estos resultados expresan que la cepa HPC se puede desarrollar normalmente en los cinco medios propuestos en este trabajo, indicándonos que no existe diferencia entre los micelios desarrollados en los medios elaborados con malta y papa y con los tres elaborados con harina de maíz, trigo y arroz. Como se observa en la figura 14; los medios líquidos resultaron ser tan efectivos como los evaluados en los trabajos de Aguilar *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2002; Guillé-Navarro *et al.*, 1998; López *et al.*, 1997. Donde demuestran que los medios líquidos son una muy buena alternativa para la producción de biomasa micelial, en muy buenas condiciones en menor tiempo que con el método tradicional.

En base a lo anterior estos medios líquidos resultó una buena alternativa para la producción de micelio. Los productores de micelio y/o semilla podrán utilizarlos indistintamente para esta cepa con la confianza que los rendimientos serán similares, así mismo se disminuirán los costos, ya que están elaborados con componentes que se encuentran a un muy bajo costo. Comparados con los costos de los medios de cultivo comerciales. Estos medios nos proporcionan el micelio y/o semilla en un menor tiempo, en estos medios el desarrollo del micelio tarda alrededor de 28 días, si se compara con el procedimiento tradicional, en la obtención de micelio (sorgo); Este presenta un lapso 45 días en la elaboración del micelio terciario, indicándonos que existe una diferencia de 17 días, los cuales podrán ser utilizados para la elaboración de más micelio.

Etapa 6:

Evaluación de la eficiencia biológica de los tratamientos.

Se obtuvo la Media y la Desviación Estándar de la eficiencia biológica de los 5 tratamientos como se observa en el (Cuadro 8); Al aplicarle el estadístico análisis de varianza (ANOVA $p > 0.05$), (Cuadro 9) y LSD se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos identificando 3 grupos el mayor representado por a (semilla), seguido por b (arroz) y por último c (maíz, trigo y papa). Como lo muestra la figura 16.

Cuadro 8. Eficiencia Biológica de los Tratamientos.				
Tratamientos	Eficiencia Biológica de los Tratamientos			
	X	±	SD	
Maíz	0.148	±	0.004	c
Trigo	0.164	±	0.009	c
Arroz	0.348	±	0.019	b
Papa	0.164	±	0.005	c
Semilla	0.587	±	0.046	a

Los valores son significativamente diferentes de acuerdo con las medias a, b y c ANOVA ($p > 0.05$).

Cuadro 9. ANOVA de un factor de la eficiencia biológica de los tratamientos líquidos y sólidos.			
Origen de las variaciones	Grados de libertad	F	Valor crítico para F
Entre grupos	4	16.781	2.626
Dentro de los grupos	37		
Total	41		

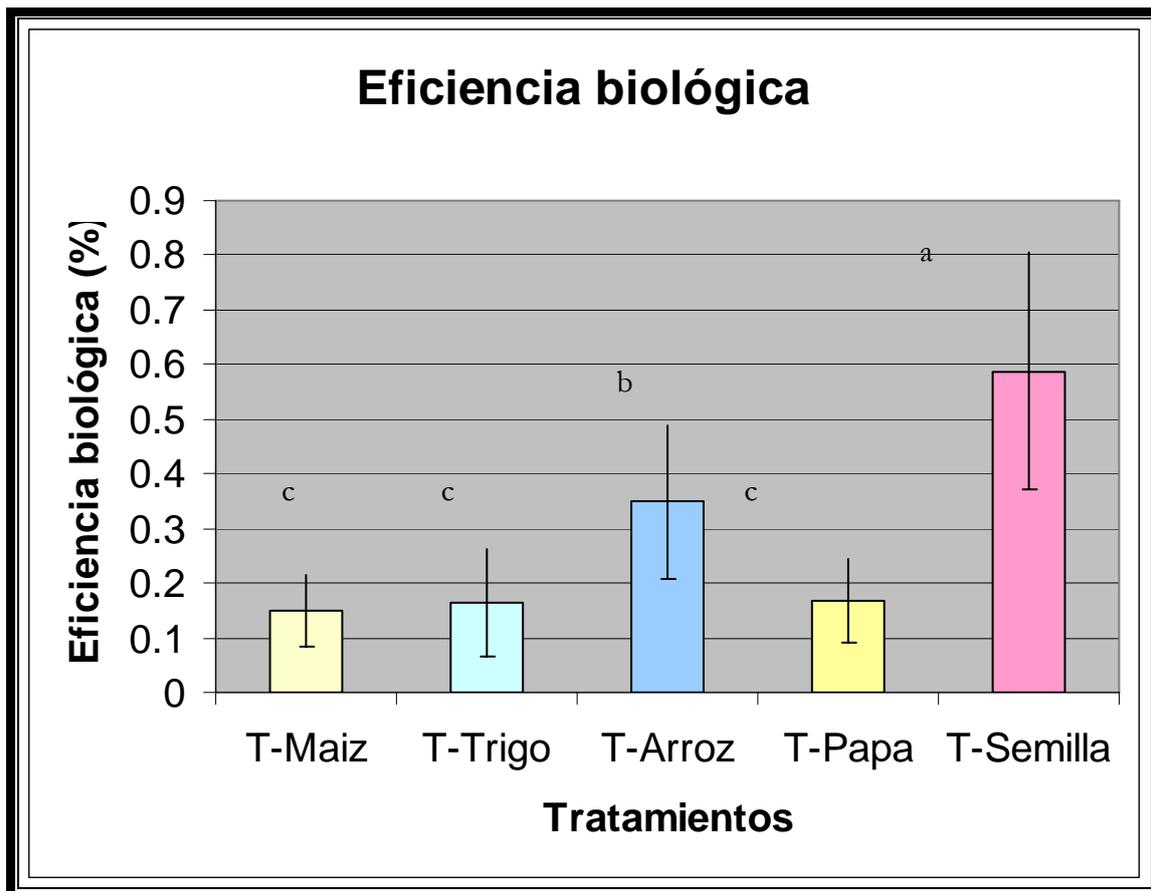


Fig 15. Muestra los promedios de la eficiencia biológica de los medios líquidos y sólidos.

Los resultados que se muestran en la figura 15, nos permiten observar que existe diferencias importantes en la eficiencia biológica que corresponde a cada tratamiento, con esto podemos inferir que el micelio desarrollado en el micelio líquido, presenta dificultad en la absorción de los nutrientes que le proporciona la paja, que a su vez se ve reflejado en la cantidad de carpóforos obtenidos de los medios líquidos que le corresponde. A pesar de lo anterior, los primeros primordios los presento el tratamiento arroz, con un lapso de 23 días, semilla (tradicionalmente utilizado) a los 25 días, los tratamientos: maíz, papa, trigo consecutivamente. Demostrándonos así que el micelio obtenido en los medios líquidos presenta una menor adaptación en el sustrato paja. De los tratamientos: maíz, trigo, arroz, papa, semilla, este ultimo fue el que presento la mayor eficiencia biológica, mientras que el tratamiento malta no presento rendimiento y por lo tanto el menos adaptado en el sustrato paja de trigo.

Los resultados del presente trabajo para el tratamiento semilla (con una eficiencia de 58.75), resulto ser similar a lo encontrado en el trabajo de Rodríguez; 1992. Quien señalaron que la eficiencia biológica es diferente en diversos sustratos y factores ambientales como la humedad y temperatura, humedad o bien como la semilla que se le proporciona.

Por tal motivo las eficiencias biológicas de los tratamientos, maíz (con una eficiencia de 14.88%),trigo(16.42%), arroz(3.48%), papa(16.68%), esta en relación con la capacidad de absorción de nutrientes y la capacidad de adaptarle al cambio, de medio líquido a substrato solidó como en este caso es la paja de trigo. (Escobar *et al* 2002).

CONCLUSIONES

- El crecimiento micelial de la cepa obtenida en este trabajo, presenta una preferencia por el medio PDA y PDA + Azúcar, demostrándonos así que la suplementación con sacarosa no le favoreció, mientras que la cepa inoculada en los medios EMA y EMA + Azúcar, presentó un crecimiento menor.
- Se mostró que es posible lograr el crecimiento micelial de la cepa HPC en medios líquidos tradicionalmente utilizados elaborados con papa y malta como los experimentales elaborados con harina de maíz, trigo y arroz, estos últimos resultando ser tan efectivos como los tradicionalmente utilizados. Demostrando así que los medios líquidos propuestos en este trabajo, son una buena alternativa para la obtención de micelio; por lo tanto la cepa HPC de *Pleurotus ostreatus*, se adaptó a los nutrientes proporcionados por estos medios líquidos. Los productores de micelio y/o semilla podrán utilizarlos con la confianza que los rendimientos serán similares a los comercialmente utilizados.
- La fructificación del micelio desarrollado en los medios líquidos, presentan dificultad en su desarrollo que se ve reflejada en y en la fructificación en el sustrato paja, esto quizás se debe a la dificultad de absorber los nutrientes que le proporciona este sustrato.

REFERENCIAS

- Aguilar, D. L., Valencia, T. G., Duran, P. E., & Garín-Aguilar, M. E. 2006. Evaluación de crecimiento micelial en inóculo Líquido y Medios Sólido de *Pleurotus spp.* IX Congreso Nacional de Micología. Champús Ensenada Baja California. México.36.
- Alexopoulos, C. J. Mims, C. W. y Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. John Wiley y sons, Inc. N.Y. 869.
- Arias, A., Soto-Velasco, C., y Guzmán-Dávalos, L. 1991. Obtención de cepas de *Pleurotus ostreatus spp* por apareamiento dimonocarion y su cultivo en bagazo de maguey tequilero. Memorias del IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, México. 110.
- Ayala, N., Carrillo, M., y Bernal, R. 1991. Comportamiento de una cepa extranjera de *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo semisintético en contraste en cuatro medios comerciales. Memorias del IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, México.92.
- Chang, S. T.1991. Recent trends in world production of cultivated edible mushrooms. Mush. J. 504:15-18.
- Cruz, L. I. 1996 Medios de cultivo suplementarios para la producción de micelio de *Pleurotus ostreatus* (jacq.: Fr) Kummer. Tesis Profesional. Chapingo. México. 55.
- Duran, D. A. Cisneros, A. E. Vargas, V. A. 2006. Bioestadística. FES Iztacala,. México. 260.
- Escobar, V. M. Nieto, M. G. Sanchez, J. E y Cruz, L. 2002. Effect of endosofa of endosulfato on micelial growth of *Pleurotus ostreatus* aud *Auricularia fuscusuccinea* in

liquid culture. In J.E. Sanchez G. Herda and E. Montiel (eds) Proceed Fourth conf. Mushroom biology an Moshrom Products. Universidad Autónoma de México Cuernavaca México. 399-408.

Gaitán, H. R. Salmones, D. Pérez. M. R y Mata, G. 2006. Manual Practico del Cultivo de Setas. Instituto de Ecología. 2° Edn., Xalapa, Veracruz. México. 56.

Guillén-Navarro, G. K. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en Cultivo sumergido. Rev. Iberoam Micol. 15:302-306.

Guzmán, G. Mata. G. Salmones, D. Soto-Velasco, C. y Guzmán-Dávalos. 1993. El Cultivo de Hongos Comestibles en Especial Atención a Especies Tropicales y Subtropicales en Equilmos Agrícolas y Residuos Agroindustriales. IPN/CECODES, México, D.F.

Leal-Lara, H. 1998. Research priorities for production of edible fungi in Mexico. Inoculum. 49.2: 31.

López, C. N. y Sánchez, V. J. E. 1997. Mycelial groth of *Pleurotus* and *Auricularia* in agroindustrial effluents. Micol. Neotrop. ALP. 10:47-56.

Manu-Tawiah y Martín, A. M.1987. *Pleurotus ostreatus* requirements of P, K, Mg and in sumerged culture.Can.J. Microbiol. 34: 620-624.

Martínez- Carrera, D. Leben, R. Morales, P. Sabal, M y Larqué-Saavedra, A. 1991. Historia del Cultivo Comercial de Hongos Comestibles en México. Ciencia y Desarrollo (CONACYT) 96:33-43.

Martínez- Carrera, D. 1997. Producción de *Pleurotus* en México. VI Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología. Tapachula. México. Octubre.15-17 p. 30.

Martínez- Carrera, D. Sabal, P. Morales, W y Martínez, M. 2004 Los hongos Comestibles, Propiedades Nutricionales, Medicinales y su Contribución a la Alimentación Mexicana. COLPOS-BUAP-UPAEN-IMNAD, Puebla.

Ramos, R. H. 1996. Obtención y caracterización de cepa de *Pleurotus spp.* Omitiendo el medio de cultivo sintético. Tesis Profesional. Chapingo. México. 83.

Rinker, D.L y Chalmers, W.1998. Specialty Mushroom Industry in Canada Mush. Word. 9,4,7-8.

Rodríguez, R. M. 1992. Caracterización de cepa de hongos comestibles *Pleurotus spp.* En medios de cultivo y su evaluación en sustratos ligno celulósicos forrajes para la producción de carpóforos. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 85.

Sánchez-Vázquez, J, E, Royser, D. 2002 la biología el cultivo de *Pleurotus spp.* ECOSUR/LIMUSA, 2° Edi. México. 294.

Ulloa, M & Herrera, T.1994. Etimología e Iconografía de Géneros de Hongos. Instituto de Biología. UNAM. 299.

United Stales Department of Agricultural. 1998. Mushrooms. Agricultural Statistics Borrada. Washington, DC.G

ANEXO

Cuadro 5. LDS del radio de la cobertura del crecimiento micelial en los medios sólidos				
	EMA + AZUCAR	EMA	PDA + AZUCAR	PDA
EMA + AZUCAR		-0.274	-1.273	-1.314
EMA	-0.274		-0.999	-1.04
PDA + AZUCAR	-1.273	-0.999		-0.041
PDA	-1.314	-1.04	-0.041	

(Duran *et al* 2006).

Cuadro 13.LDS de la eficiencia biológica de los tratamientos líquidos y sólidos					
	Maíz	Trigo	Arroz	Papa	Semilla
Maiz		0.0179	0.1999	0.0179	0.4386
Trigo	-0.0153		0.1837	0.0025	0.4232
Arroz	-0.0199	-0.1837		-0.1811	0.2395
Papa	-0.0179	-0.0025	0.1811		0.4206
Semilla	-0.4386	-0.4232	-0.2395	-0.4206	

(Duran *et al* 2006).