



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN
EN LA PRODUCCIÓN DE SUSTRATOS
SELECTIVOS PARA EL CULTIVO DE *Pleurotus
ostreatus***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

VLADIMIR TEODORO CASTAÑEDA DE LEÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. HERMILO LEAL LARA

MÉXICO, D.F.

MAYO 2007



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.

Agradezco al CONACYT el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 182693

Comité Tutorial de Tesis:

Dr. Hermilo Leal Lara

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dra. Margarita Hermelinda Villegas Ríos

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Facultad de Ciencias, por mi formación académica.

Quiero agradecer, especialmente al Dr. Hermilo Leal Lara mi director de tesis, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por compartir sus conocimientos y especialmente por su apoyo, confianza y amistad.

A la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo, por su gran ayuda para realizar el análisis estadístico correspondiente a este trabajo y por las sugerencias para la mejora del mismo, por su amabilidad, disposición y amistad.

A mi comité Tutorial Dr. Hermilo Leal Lara, Dra. Concepción Toriello Nájera, Dra. Margarita Hermelinda Villegas Ríos, Dr. Gerardo Mata Montes de Oca y M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo por su valiosa revisión a este manuscrito y sus acertadas sugerencias.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa a través del laboratorio de hongos comestibles, donde se realizó parte del trabajo experimental, al M. en C. José María Barba Chávez y al Dr. Javier López Cruz, por el apoyo brindado a este trabajo, por sus valiosos comentarios y disposición, así como por su amistad.

Y por último y no por ello menos importante a mi familia, mi esposa e hijos por su paciencia y amor, y a mis padres por haberme dado la gran oportunidad de crecer en la vida.

A todos ellos GRACIAS

Vladimir Teodoro Castañeda de León.

INDICE

RESUMEN	0
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- El complejo <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
2.2.- Producción a pequeña escala de <i>Pleurotus ostreatus</i> en México	3
2.3.- Producción industrial de <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
2.4.- Producción de sustratos selectivos para el cultivo del champiñón.....	8
2.5.- Sustratos selectivos para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
3.- JUSTIFICACIÓN	11
4.- HIPÓTESIS	12
5.- OBJETIVOS	13
5.1.- OBJETIVO GENERAL	13
5.2.- OBJETIVOS PARTICULARES	13
6.- MATERIALES Y MÉTODO	14
6.1.- PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	14
6.2.- TOMA DE MUESTRAS	15
6.2.1.- Experimentos a escala laboratorio	15
6.2.2.- Experimentos a escala industrial.....	15
6.3.- MÉTODOS Y REACTIVOS	17
6.3.1.- Material biológico	20
6.3.2.- Evaluación de crecimiento micelial	20

6.3.3.- Determinaciones químicas.....	20
6.3.4.- Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos.....	21
6.3.5.- Análisis estadísticos.....	21
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
7.1.- ESTUDIO DEL PROCESO A ESCALA INDUSTRIAL DE PREPARACIÓN DE SUSTRATOS	23
7.1.1.- Evaluación de crecimiento micelial	23
7.1.2.- Contaminación en el desarrollo micelial	29
7.1.3.- Temperaturas en pilas de fermentación	30
7.1.4.- pH y Humedad.....	30
7.1.5.- Azúcares reductores	32
7.1.6.- Producción de cuerpos fructíferos	32
7.2.- MONTAJE A ESCALA LABORATORIO DE LAS CONDICIONES PARA LA PREPARACIÓN DE SUSTRATOS SELECTIVOS	36
7.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE EXPERIMENTOS A ESCALA LABORATORIO (LOTES 1, 2, 3).	38
7.3.1.- Desarrollo micelial	39
7.3.2.- Contaminación en el desarrollo micelial	52
7.3.3.- Azúcares reductores.....	57
7.3.4.- Producción de cuerpos fructíferos	72
7.3.5.- Evaluación del efecto de las condiciones de procesamiento del sustrato sobre la producción de cuerpos fructíferos	76
7.3.6.- Humedad y pH.....	82
7.3.7.- Temperaturas de fermentación	83
8.- CONCLUSIONES	85
9.- LITERATURA CITADA.....	89
10.- ANEXO.....	93

RESUMEN

El cultivo de hongos comestibles es una actividad productiva que se ha desarrollado ampliamente tanto en México como a nivel mundial. El sistema de pasteurización por inmersión en agua caliente como tratamiento del sustrato ha sido utilizado considerablemente por productores de *Pleurotus ostreatus*. Este método desafortunadamente no es confiable por ineficiente ya que presenta desventajas técnicas y económicas, ocasionando que muchos productores no hayan sido capaces de consolidar sus empresas exitosamente. La producción de sustratos selectivos es un factor sumamente importante para un buen desarrollo y producción de *Pleurotus ostreatus*, disminuyendo notablemente los problemas de contaminación e incrementando los rendimientos. Dado que los sustratos producidos por procesos a gran escala son por lo general más confiables y “selectivos”, se planteó en ésta tesis identificar las condiciones que adquieren los sustratos para lograr un desarrollo selectivo de *P. ostreatus*, definiendo las condiciones de procesamiento para la elaboración de tales sustratos.

En una primera etapa se evaluaron los procedimientos de preparación de sustrato a escala industrial para *P. ostreatus*, valorando sus condiciones y características. Considerando los resultados obtenidos y la información bibliográfica, en una segunda etapa se montó un sistema a escala laboratorio, para evaluar, caracterizar y definir los métodos de procesamiento de sustratos selectivos. Se controlaron variables como humedad, temperatura y aeración (volteos), así mismo, los tiempos de fermentación, pasteurización-acondicionamiento. Los sustratos que presentaron las mejores condiciones y características para una eficiente producción de *P. ostreatus*, fueron los que se sometieron a procesos de 2 días de fermentación a 50°C, pasteurización por 10 h a 60°C y un acondicionamiento por 48 h a 50°C.

SUMMARY

The cultivation of edible mushrooms is a productive activity that has been broadly developed as much in Mexico as at world-wide level. The system of pasteurization by hot water bath as a treatment of the substrate has been used considerably by producers of *Pleurotus ostreatus*. This method unfortunately is not reliable by inefficient since it presents technical and economic disadvantages, causing that many producers have not been able to consolidate their companies successfully. The production of selective substrates is an extremely important factor for a good development and production of *Pleurotus ostreatus*, decreasing the contamination problems remarkably and increasing the yields. Since the substrates produced by processes on industrial scale are generally more reliable and “selective”, this thesis considered to identify the conditions that acquire the substrates to obtain a selective development of *P. ostreatus*, defining the conditions of processing for the elaboration of such substrates.

On first stage the procedures of preparation of substrate on industrial scale for *Pleurotus ostreatus* were evaluated, valuing their conditions and characteristics. Considering the results obtained and the bibliography, on second stage a scale laboratory system was mounted, to evaluate, characterize and define the methods of processing of selective substrates. Variables like humidity, temperature and ventilation (turn over) were controlled, also the times of fermentation, pasteurization and conditioning. The substrates that displayed the best conditions and characteristics for an efficient production of *P. ostreatus*, were those that was put under a 2 days fermentation process at 50°C, 10 h of pasteurization at 60°C and 48 h of conditioning at 50°C.

1 INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el cultivo de hongos comestibles es una actividad productiva alternativa que ha adquirido gran importancia en años recientes desde el punto de vista alimenticio, económico y ecológico. El proceso para la producción de *Pleurotus ostreatus* consta de dos etapas, la primera implica la producción de un sustrato que presente características adecuadas, el cual en la segunda etapa, se utilizará como base nutritiva para el desarrollo micelial y producción de cuerpos fructíferos. Es por ello, que a pesar de que cada una de las dos etapas se caracteriza por requerimientos e instalaciones distintas, los sistemas existentes para la producción de *P. ostreatus* se distinguen esencialmente con base en el procedimiento seguido para la preparación del sustrato. La selectividad del sustrato depende en gran medida del tipo y condiciones de los procesos seguidos para su preparación.

La eficiencia en la producción de cuerpos fructíferos depende fundamentalmente de la calidad del sustrato. En la actualidad la mayoría de los pequeños productores utilizan el sistema de pasteurización por inmersión en agua caliente, como único sistema de tratamiento del sustrato. Sin embargo, este sistema presenta desventajas de tipo técnicas y económicas que a largo plazo, han sido los principales factores que ha provocado el fracaso de la mayoría de estos productores.

Para evitar pérdidas en la producción de hongos comestibles y eficientar la asimilación de nutrientes disponibles, es entonces necesario producir sustratos selectivos. El procesamiento de sustratos selectivos es un factor sumamente importante como soporte para el buen desarrollo de *P. ostreatus*, ya que permite disminuir los problemas de contaminación, incrementar los rendimientos y agotar los nutrimentos del sustrato (Stölzer y Grabbe, 1991). Existen escasos reportes sobre los factores que influyen en la producción de sustratos selectivos para el cultivo del hongo comestible *P. ostreatus*.

En esta investigación se estudiaron algunos de los factores que influyen en la producción de sustratos “selectivos” a nivel industrial. Se registraron los tiempos empleados en las etapas de fermentación, pasteurización- acondicionamiento, así como la temperatura, humedad, aeración (volteos), pH, concentración de azúcares reductores, desarrollo micelial, contaminación y rendimientos. Posteriormente, en condiciones de laboratorio, se estableció un sistema que permitiera reproducir de manera controlada los parámetros de procesamiento empleados a nivel industrial, para evaluar las características de los sustratos producidos en términos de su capacidad de sustentar un buen desarrollo micelial y producción de cuerpos fructíferos del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

2 ANTECEDENTES

2.1 El complejo *Pleurotus ostreatus*.

El género *Pleurotus* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye varias especies comestibles de alto valor económico en muchos países. *Pleurotus ostreatus* es una de las especies más cultivada a diferentes escalas. Se ha observado que existe una estrecha relación entre las diferentes especies del género *Pleurotus* tal como lo muestran estudios basados en la secuenciación de genes (ARN ribosomal), así mismo, se ha encontrado relación entre los caracteres morfológicos, de crecimiento, de distribución geográfica y de sustrato. Un ejemplo de esto lo representan especies, como *P. populinus*, *P. pulmonarius*, *P. abieticola* y *P. eringii*, que se incluyen dentro del complejo *Pleurotus ostreatus* (Calvo-Bado, 2001).

2.2 Producción a pequeña escala de *Pleurotus ostreatus* en México.

La producción de *P. ostreatus* en México se inicia a mediados de los años setenta por una empresa dedicada entonces a la producción de champiñones, llamada “Hongos Leben”. A partir de entonces, un gran número de productores a pequeña escala han surgido y desaparecido sucesivamente. A pesar del uso a nivel laboratorio de diversos sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*, la paja de trigo (*Triticum aestivum*), es la más ampliamente utilizada por los productores de todos los niveles, debido a su estructura, composición, disponibilidad y costo.

Los sistemas para la producción de *P. ostreatus* se distinguen básicamente en función de los procesos seguidos para la preparación del sustrato. Una de las operaciones unitarias extensamente utilizadas por los pequeños productores para el tratamiento del sustrato, es la pasteurización por inmersión en agua caliente. En este proceso la paja se sumerge en un tambo con agua, a una temperatura entre 60 y 80°C por 30 minutos a 1 h (aun cuando pueden variar las temperaturas y tiempos, así como las dimensiones y geometría de los

recipientes utilizados para este método). Posteriormente el exceso de agua es drenado y la paja se deja enfriar para su siembra, colocando capas alternadas de sustrato y semilla, dentro de bolsas de plástico con diferentes capacidades (Staments y Chilton, 1983; Guzmán *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2003).

La mayoría de los productores que han utilizado este procedimiento de preparación del sustrato han tenido que cerrar sus empresas después de unos meses de operación debido en gran medida a las desventajas de tipo técnico y económico que representa este sistema, como son: un alto consumo de agua y energía (combustible), generación de aguas residuales (lixiviados) altamente contaminantes, entre otros.

Houdeau *et al.*, (1991) postulan que al sumergir el sustrato en agua caliente puede tener diferentes consecuencias según el material utilizado, ya que se presenta un efecto de lavado de nutrientes durante la inmersión en agua que resulta negativo en sustratos con tiempos prolongados de almacenamiento (viejos), principalmente por la pérdida de nutrientes que son utilizados para el posterior desarrollo de *Pleurotus*. Adicionalmente, se ha postulado que al aplicar la pasteurización por inmersión en agua, se debe sumergir la paja únicamente cuando el agua alcanzando temperaturas adecuadas para este fin ($>60^{\circ}\text{C}$), como para provocar un choque térmico que difícilmente soporten los organismos que se encuentran en el sustrato. Sí este es sumergido antes de que el agua alcance dicha temperatura, muchos organismos termo-resistentes tendrán la posibilidad de adaptarse al incremento paulatino de la temperatura y en ese caso el tratamiento térmico será ineficaz.

Por otra parte, se ha observado que el sistema por inmersión en agua puede funcionar bien sólo en lugares donde la humedad ambiental es baja y se permite un escurrido rápido del agua excedente, en contraste, si la humedad relativa del lugar es alta el control del contenido de agua en el sustrato después de la pasteurización puede requerir mayor manipulación del material, lo que incrementa los riesgos de contaminación. Por lo que, el escurrido, enfriado, siembra y envasado del sustrato deben de realizarse con rapidez ya que estas operaciones requieren de una gran asepsia por la gran facilidad con la que la paja se contamina (López *et al.*, 1995 y 1996; Bello y Sánchez, 1996). Los inconvenientes antes

mencionados entre otros, hacen que la implementación del sistema de pasteurización por inmersión en agua caliente como único tratamiento del sustrato resulte a largo plazo inoperante (Muez-Ororbía y Pardo-Núñez, 2001).

2.3 Producción industrial de *Pleurotus ostreatus*.

Actualmente solo una empresa (Hongos Leben), ha logrado permanecer en la escena nacional y representa el mayor productor de setas del mercado en nuestro país. Cuando se realizó esta investigación, Hongos de México que es el mayor productor de champiñones en Latinoamérica, manejaba también una producción más o menos constante de setas. Esta última empresa accedió a que se realizara un seguimiento a su proceso de preparación del sustrato mediante la toma de muestras durante las diferentes etapas del mismo.

Cabe señalar que los sistemas de producción de sustratos empleados por Hongos Leben y Hongos de México son similares a los procesos empleados por las grandes compañías productoras de setas en Europa y EUA. En términos generales, estos procesos guardan gran semejanza con los empleados para la elaboración de sustratos para el cultivo del champiñón. Una de las principales diferencias es que durante la elaboración del sustrato para el cultivo de *Pleurotus* no se emplean fuentes adicionales de nitrógeno (estiércoles o pastas de oleaginosas), sino exclusivamente pajas. Así mismo, se utiliza una etapa de fermentación al aire libre o composteo, pero esta es más breve (3 a 6 días), en comparación con las casi 2 semanas empleadas para el sustrato del champiñón. La pasteurización del sustrato es similar en ambos cultivos (8-10 h a 60°C), pero el posterior acondicionamiento a 48-50°C es más breve para *Pleurotus*, ya que se completa en 3 ó 4 días mientras que para el sustrato de champiñón se extiende hasta 6 días. Entre las distintas empresas se presentan variaciones en las temperaturas, períodos, dimensiones de las pilas y volteos utilizados en cada etapa, dependiendo de las instalaciones, experiencia y “sentido común” de cada seticultor.

El proceso industrial para la producción de sustratos para *Pleurotus* consta básicamente de las siguientes 2 etapas:

ETAPA 1

En la primera etapa se distinguen 2 operaciones que algunas veces se realizan de manera secuencial o en la misma operación.

- A) **PICADO Y MOJADO DE LA PAJA.** Para que el proceso se inicie, la materia prima (paja de trigo principalmente), es reducida eventualmente de tamaño (~5 cm) y humedecida a saturación por medio de un riego intenso, de tal forma que se integre lo más rápido posible la mayor cantidad de agua, alcanzando un 75% de humedad. Se deben evitar lixiviados de la paja, por lo que en ocasiones es apilada en grandes montones de forma piramidal, cónica o semielípticos, o bien, con máquinas composteadoras se forman “cordones” o “pilas” de dimensiones mas pequeñas (~2 a 2.5 m de ancho, 1.5 a 2 m de altura). De esta manera, la paja absorbe agua y empiezan a aumentar las temperaturas en el interior de los montones, como resultado del metabolismo de los microorganismos acarreados por la misma, que transforman los azúcares presentes en la paja.
- B) **FERMENTACIÓN (A CIELO ABIERTO) O COMPOSTEO.** Una vez que se ha iniciado el incremento de temperaturas en el sustrato, se forman “pilas” semielípticas de aproximadamente 2 a 2.5 m de ancho, 1.5 a 2 m de altura y 60 m de largo; las dimensiones de la pila varia dependiendo de la capacidad de cada planta de procesamiento. La paja es mezclada 1 ó 2 veces al día para aerearla y homogeneizar todo el material que se encuentra en la pila. En cada volteo se agrega el agua necesaria para lograr que la paja alcance y mantenga su máximo nivel de saturación. Esto provoca una fermentación aerobia por lo que a esta etapa se le ha denominado “fermentación a cielo abierto”, “fermentación”, “fermentación libre”, “composteo”, “fermentación aerobia”, “fermentación en el medio natural”, o “pre-fermentación” (Vedder, 1996; Muez-Ororbia y Pardo-Núñez, 2001; Stamets y Chilton, 1983; Choi, 2004). Al tercer ó cuarto día, algunos productores agregan carbonato de calcio al mezclar la paja húmeda. Al quinto ó sexto día, el material se mezcla nuevamente antes de someterlo a la etapa de pasteurización.

ETAPA 2

De igual forma, en esta etapa se distinguen 2 operaciones, las cuales se realizan secuencialmente pero en la misma instalación, es decir en el túnel de pasteurización.

C) “PASTEURIZACIÓN”. El sustrato es llevado a un túnel de pasteurización. La temperatura del sustrato primero se nivela a un intervalo de 45 a 48°C recirculando aire a través de la capa superior del sustrato. Posteriormente y en caso necesario, con inyección de vapor, la temperatura se eleva a 60°C y se mantiene por 6 a 10 h para la pasteurización, que tiene como principal objetivo la eliminación de microorganismos contaminantes y larvas de insectos que se desarrollaron en el sustrato durante la etapa anterior de “fermentación a cielo abierto”.

D) “ACONDICIONAMIENTO”. Al finalizar la pasteurización, se inyecta aire fresco al túnel de fermentación para bajar la temperatura del sustrato a 50°C, y se mantiene así durante 3 ó 4 días, etapa que se conoce como “acondicionamiento”. Bajo estas condiciones, se favorece el desarrollo de una microflora termofílica aerobia, la cual se ha propuesto es responsable del consumo de los últimos azúcares solubles presentes en el sustrato y de la formación de compuestos antagónicos a mohos nocivos para el desarrollo micelial de *Pleurotus* (Muez-Ororbía y Pardo-Núñez, 2001; Choi, 2004; Velázquez -Cedeño *et al.*, 2006 a b). Finalmente se deja enfriar la paja hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 25°C para la siembra.

Una vez terminadas estas etapas, el sustrato presenta las características necesarias para el posterior desarrollo del micelio y producción de cuerpos fructíferos. Para el cultivo de *P. ostreatus* se requiere un sustrato selectivo que favorezca su crecimiento micelial y la producción de esporóforos, al mismo tiempo que inhiba el crecimiento de organismos contaminantes y antagonistas. Los materiales como pajas, aserrines y bagazos entre otros, son colonizados fácilmente por mohos, como: *Trichoderma*, *Penicillium* y *Gilmaniella* (los más comunes). Esta problemática se soluciona en experimentos a nivel laboratorio esterilizando el sustrato, pero a escala industrial el problema se resuelve creando sustratos

selectivos. La diferencia en los requerimientos nutricionales entre *P. ostreatus* y los mohos contaminantes y antagonistas, es la base para lograr un sustrato selectivo. La proliferación de los hongos contaminantes se favorece con la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación, mientras que *P. ostreatus* utiliza con mayor facilidad los componentes lignocelulósicos del sustrato (Stölzer y Grabbe, 1991; Houdeau *et al.*, 1991).

2.4 Producción de sustratos selectivos para el cultivo del champiñón.

En el método de preparación de sustratos para cultivar champiñón (*Agaricus* spp.), se ha observado que ocurren ciertos fenómenos mediante los cuales el sustrato adquiere selectividad durante las diferentes etapas de preparación, estas características podrían ser básicas y comunes en la elaboración de sustratos selectivos para el cultivo de algunos hongos comestibles, *Pleurotus* spp. entre estos. Para el cultivo del champiñón se sabe que la fermentación persigue sobre todo liberar y transformar las materias nutritivas presentes en la paja y el estiércol, para posteriormente suministrárselas al champiñón. La paja contiene diversas fuentes de carbono, predominando la celulosa y lignina que son de difícil asimilación. Una menor proporción se presenta en forma de azúcares y polisacáridos fácilmente degradables. Durante el cultivo, ciertos hongos competidores se desarrollan sobre los hidratos de carbono de fácil asimilación. Algunos de estos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Spicaria*, pueden afectar considerablemente los cultivos. Por esta razón, la mayor parte de dichas fuentes de carbono se deben eliminar mediante las diferentes etapas de preparación del sustrato. Al final de la pasteurización- acondicionamiento se obtiene un sustrato selectivo donde el champiñón crece mejor que la mayoría de los hongos contaminantes (Gray *et al.*, 1971; Fermor *et al.*, 1979; Vedder, 1996).

Durante las etapas de fermentación, pasteurización y acondicionamiento se logra aumentar la retención de agua del sustrato y transformar los diversos elementos nutritivos gracias a la

participación de diversos microorganismos. Los agentes biológicos que provocan estas transformaciones son sobre todo, bacterias mesófilas y termófilas, actinomicetos y cierto número de hongos termófilos. Gran parte de los azúcares de fácil asimilación sirven de alimento a estos microorganismos durante la fermentación, transformándose en forma de CO₂, vapor de agua, calor y produciendo biomasa.

Debido a las altas temperaturas de la fermentación termofílica, se forma también un complejo entre los polisacáridos de la pared celular de las bacterias y la lignina, conocido como complejo ligno-húmico que representa una fuente selectiva de nutrientes para el champiñón (Vedder, 1996). Al final de este proceso, casi todos los azúcares de fácil asimilación habrán desaparecido, mientras que los carbohidratos complejos permanecen. Esta selección favorece al champiñón, que utiliza las combinaciones de polisacáridos entre otros la celulosa y el complejo ligno-húmico como alimento, mientras que sus competidores precisan de carbohidratos fácilmente asimilables. La composta se ha hecho selectiva para determinado tipo de hongo, en este caso para el champiñón (Gray *et al.*, 1971; Fermor *et al.*, 1979; Vedder, 1996).

2.5 Sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

Existen pocos reportes sobre los factores que influyen en la producción de sustratos selectivos para el cultivo de *P. ostreatus*. Sin embargo, se han realizado algunos trabajos que nos proporcionan información básica para el estudio de estos factores. Investigaciones realizadas por Schies y Lelley (1989) sobre la producción de sustratos por fermentación semi-anaeróbica, indican que *P. ostreatus* mostró un buen desarrollo micelial en paja fermentada por 7 ó 14 días, mientras que el hongo contaminante *Trichoderma hamatum* predominaba en la paja si la fermentación se prolongaba a 21 días. Los autores suponen como explicación a este fenómeno, la presencia en la paja de sustancias insolubles en agua que inhiben el crecimiento micelial de *T. hamatum* pero no el de *P. ostreatus*. Esencialmente, los mecanismos de defensa propuestos que presenta la paja durante los primeros 14 días de fermentación, serían la presencia de capas de cutina y algunos

productos metabólicos microbianos, estos constituirían una barrera al ataque de mohos contaminantes que posteriormente pierden su efectividad al avanzar la fermentación.

El resultado del estudio anterior podría explicarse en función del consumo de los azúcares solubles en la paja durante la fermentación anaerobia que son utilizados para la producción de ácido láctico, de acuerdo a los datos presentados por Houdeau *et al.* (1991). Estos investigadores observaron un incremento en los rendimientos cuando la paja se remojava por períodos de 60 h, lo cual implica un lixiviado de la mayoría de los componentes solubles, azúcares simples entre ellos; adicionalmente, reportaron una mayor presencia y desarrollo de hongos contaminantes en los sustratos no lixiviados, estos microorganismos son frecuentemente fuertes antagonistas de *P. ostreatus* durante la invasión micelial. Así mismo, registraron la presencia de distintos microorganismos en los sustratos durante la incubación; algunos específicos de la paja de trigo como son *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Exophiala* y *Cladosporium*, los cuales no presentan efectos antagónicos para *P. ostreatus*. También encontraron durante la incubación otros hongos que si pueden ser antagónicos para *P. ostreatus*, como: *Mucor*, *Trichoderma*, *Trichurus*, *Stysanus*, *Mortierella*, *Aspergillus* y *Penicillium*. De acuerdo a los autores, la presencia de los azúcares solubles que no fueron eliminados por lixiviación provocaba incrementos importantes en la temperatura dentro del sustrato durante la incubación, lo cual constituía un factor adicional para el rápido desarrollo de *Mucor*, *Trichoderma* y *Trichurus*.

Con esta información y partiendo del enfoque para la producción industrial de sustratos para el cultivo de champiñón (*Agaricus* spp.), Stölzer y Grabbe (1991) buscaron disminuir el contenido de azúcares solubles por medio de fermentación. Estos autores demostraron que los tratamientos térmicos tienen una influencia decisiva sobre la selectividad del sustrato. La pasteurización a 75 y 85°C durante 24 h permitía el crecimiento tanto de hongos contaminantes como de *P. ostreatus*; mientras que sólo el tratamiento a 65°C producía un sustrato que suprimía casi todos los hongos contaminantes y permitía el crecimiento de *P. ostreatus*. Durante la fermentación a 65°C observaron un rápido desarrollo de bacterias termófilas y propusieron que algunas de estas bacterias aisladas de la paja de trigo, son capaces de suprimir hongos contaminantes sin afectar el desarrollo

micelial de *P. ostreatus*. De igual forma, observaron que la pasteurización de la paja a altas temperaturas provoca una liberación de azúcares como glucosa, y no obstante que la paja tratada a 65°C también presentaba una liberación de azúcares después de 24 h de incubación, estos azúcares que son fuente de carbono disponible para los mohos contaminantes eran completamente metabolizados por las bacterias termófilas. El empobrecimiento de los azúcares y alcalinización de la paja durante el proceso de fermentación, de acuerdo a Stölzer y Grabbe (1991) son factores críticos para la producción de sustratos selectivos.

3 JUSTIFICACIÓN

A la fecha no existe una metodología probada y estandarizada para la preparación de sustratos selectivos en el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, utilizada de manera generalizada para este propósito y que sea del dominio público. Existe una diversidad de propuestas para el tratamiento del sustrato, con ciertas ventajas y desventajas pero que en general se realizan con una gran dosis de empirismo. En México, esta situación es una constante y tal vez ha sido una de las principales causas que ha limitado el éxito y expansión en el cultivo de este hongo. Resulta entonces muy importante identificar las variables que permitan establecer un proceso confiable de preparación del sustrato adecuado para el crecimiento del hongo *P. ostreatus*. Este es un factor que contribuiría a aumentar el éxito en el cultivo, disminuyendo el riesgo de contaminaciones, mejorando la invasión micelial y la eficiencia biológica. El enfoque que este estudio propone para la elaboración de sustratos selectivos, es dar seguimiento a los cambios que ocurren en los procesos industriales durante la elaboración de sustratos para *Pleurotus ostreatus*. Se pretende de esta manera identificar los factores críticos que determinan la producción de sustratos selectivos no estériles, y posteriormente estudiar el comportamiento de estos factores bajo condiciones controladas de laboratorio para determinar y estandarizar las condiciones de elaboración de sustratos que presenten mayor selectividad.

4 HIPÓTESIS

- La implementación de un sistema eficaz de pretratamiento del sustrato (fermentación, pasteurización-acondicionamiento), producirá cambios físico-químicos y biológicos en el sustrato, que permitirán la obtención de sustratos selectivos adecuados para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, ya que este hongo comestible tiene la capacidad de metabolizar las fuentes complejas de carbono, como celulosa, hemicelulosa y lignina, inaccesibles para los mohos contaminantes y antagonistas.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Identificar los parámetros de procesamiento de sustratos a escala industrial para posteriormente reproducirlos a escala laboratorio y confirmar su validez en la elaboración de sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar las condiciones utilizadas para la elaboración de sustratos a nivel industrial. Así como los cambios que ocurren en el sustrato durante este proceso, con énfasis en las características de mayor relevancia para la selectividad como: azúcares reductores, humedad, temperatura, volteos y pH, en las diferentes etapas de fermentación, pasteurización-acondicionamiento.
- Confirmar en condiciones controladas de laboratorio, la eficacia de los parámetros de procesamiento en la producción de sustratos selectivos para el cultivo de *P. ostreatus* tales como: períodos de fermentación, pasteurización y acondicionamiento, concentración de azúcares reductores, temperatura, humedad del sustrato, aireación (volteos) y pH.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

Los estudios previamente discutidos señalan la importancia de disminuir la concentración de azúcares en los sustratos utilizados para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* durante los procesos industriales. Esta disminución está asociada al efecto benéfico producido por el desarrollo de algunos microorganismos durante la etapa de fermentación. En este trabajo, se estudiaron las características presentadas en los materiales preparados a escala industrial que permiten un desarrollo selectivo de *P. ostreatus*, para definir las condiciones de procesamiento que conducen a la producción de sustratos selectivos.

En una primera etapa, se planteó evaluar los procedimientos de preparación de sustrato a escala industrial para el cultivo de *P. ostreatus* identificando las condiciones, características y cambios que ocurren durante estos procesos. Para ello se logró con el apoyo de una planta comercial productora de hongos, para tomar muestras durante las diferentes etapas del proceso de preparación de sustrato. Debido a la logística de producción de la empresa, únicamente se consiguió tener acceso al material de estudio en dos diferentes ciclos de trabajo, clasificados por la empresa como lotes 4 y 5.

En una segunda fase, tomando en cuenta los resultados obtenidos inicialmente y la información bibliográfica que se ha publicado sobre los procesos de preparación del sustrato, se hizo un montaje a escala laboratorio de un sistema que permitiera evaluar y caracterizar las condiciones de procesamiento para la elaboración de sustratos selectivos. Para este objetivo, se controlaron las condiciones de humedad y aireación (volteos del sustrato), así como la duración y temperaturas de las etapas de fermentación, pasteurización-acondicionamiento.

6.2 TOMA DE MUESTRAS.

La obtención de muestras representativas durante las dos etapas de la investigación fue de fundamental importancia, para determinar las características de los sustratos y el efecto que tienen sobre este material los diferentes tiempos de fermentación y tratamientos térmicos utilizados.

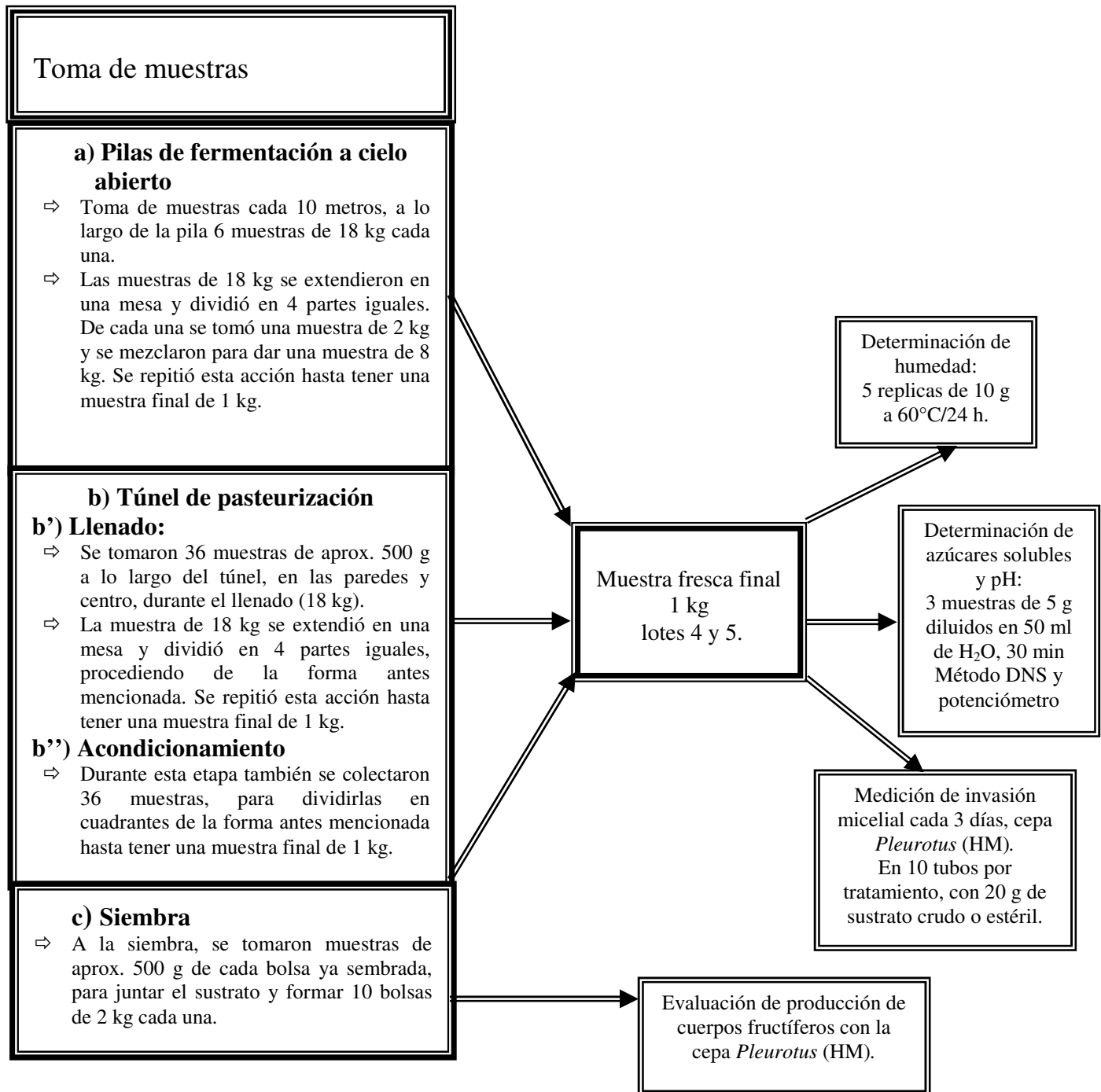
6.2.1 Experimentos a escala industrial.

Para los experimentos a escala industrial, se realizaron muestreos a lo largo de la pila de fermentación (60 m largo). En esta etapa, se tomaron muestras cada 10 m, una en la parte superior (2 m altura) y una a cada costado de la pila (2.5 m ancho). En el período de pasteurización y acondicionamiento, se tomaron muestras al llenado del túnel, durante y al final de ambos procesos, colectándose muestras representativas de aproximadamente 18 kg en cada ocasión. Cada muestra de 18 kg se colocó en una mesa de trabajo para mezclarla y dividirla en cuatro partes iguales, seguido a esto se obtuvieron cuatro muestras de 2 kg, resultando en una muestra de 8 kg. Se repitió esta acción hasta tener una muestra final de 1 kg, para las diferentes evaluaciones y análisis. Adicionalmente, se tomo una muestra de 20 kg a la siembra del sustrato para los experimentos de producción de cuerpos fructíferos, como se indica en la **Figura 1**.

6.2.2 Experimentos a escala laboratorio.

En los experimentos a nivel laboratorio, el sustrato se preparó picando 4 pacas de paja de trigo de ~30 kg peso seco hasta un tamaño de aproximadamente 5 cm con una picadora de doble cuchilla (SIEMENS M-30) (es importante señalar que de todo el material, cuatro pacas de paja en total, dos fueron adquiridas primero y utilizadas en una serie de experimentos que involucró al lote 1, mientras que las otras dos pacas se compraron y utilizaron después para los experimentos de los lotes 2 y 3).

Figura. 1. Obtención de muestras para evaluaciones químicas y biológicas a escala industrial.

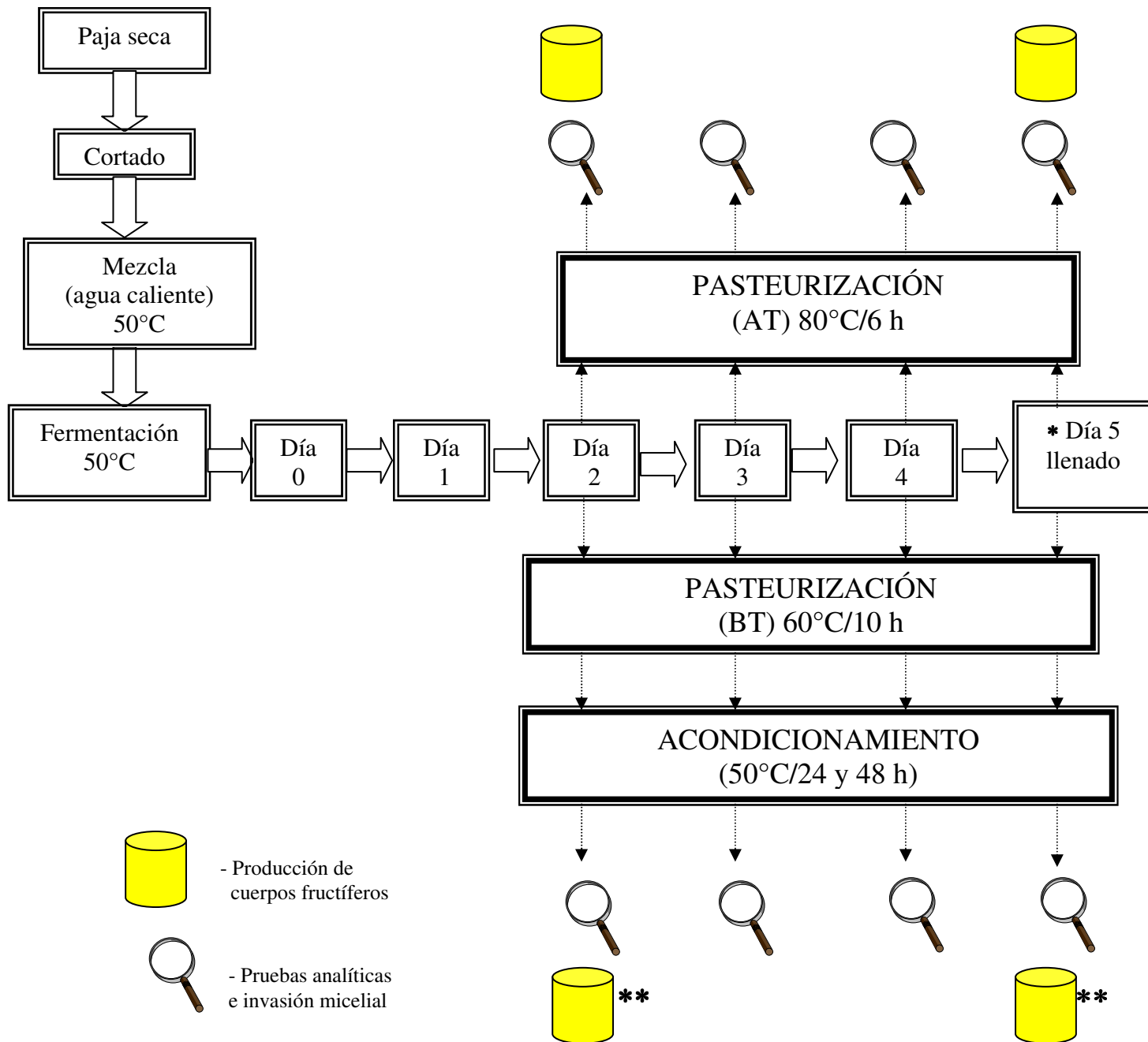


En 6 cajas de plástico, de 58 cm de largo x 37 cm de ancho y 28 cm de altura, con tapa. Se colocaron 5 kg de paja (peso seco) en cada caja, posteriormente se agregó gradualmente agua caliente (a 50°C) hasta alcanzar un volumen de 5 litros por caja, mezclando la paja conforme se agregaba el agua. Las cajas con paja húmeda se colocaron en un cuarto de temperatura controlada (a 50°C) durante la etapa de fermentación y acondicionamiento. El sustrato se mezclaba 3 veces al día, buscando homogeneizar la humedad y proporcionar aeración al mismo tiempo (**Figura 2**).

Para estos experimentos se acondicionó un cuarto de 3 x 3 m, recubriendo sus paredes con material aislante (3" de poliestireno espumado), utilizando un sistema de calefacción (FRIGOTHERM, MM-032) con la finalidad de mantener una temperatura constante de 50°C. Se prepararon 3 lotes con períodos de fermentación de hasta 5 días. Se probaron dos condiciones de pasteurización, una de alta temperatura (AT), a 80°C por 6 h, y otra de baja temperatura (BT) a 60°C por 10 h, para lo que se utilizaron 2 estufas de temperatura controlada. Únicamente los sustratos pasteurizados a baja temperatura fueron sometidos a un período de acondicionamiento a 50°C por 24 y 48 h. Se tomaron muestras diariamente a partir del día 2 y hasta el día 5 de fermentación, al inicio y final de la pasteurización y a las 24 y 48 h de acondicionamiento (**Figura 2**).

En los experimentos a nivel laboratorio, las muestras se obtuvieron tomando la totalidad de paja húmeda contenida en una caja de plástico. Este material se volcó sobre una mesa de trabajo y mezcló en repetidas ocasiones para lograr homogeneidad. El material se extendía y dividía en 4 cuadrantes iguales, tomando de cada cuadrante una muestra de 2 kg. Las 4 muestras obtenidas se mezclaban y los 8 kg que resultaban se extendían para volver a tomar en este caso 1 kg de sustrato en cada una de las 4 secciones resultantes, este procedimiento se repitió nuevamente hasta llegar a una muestra final de 1 kg (**Figura 3**).

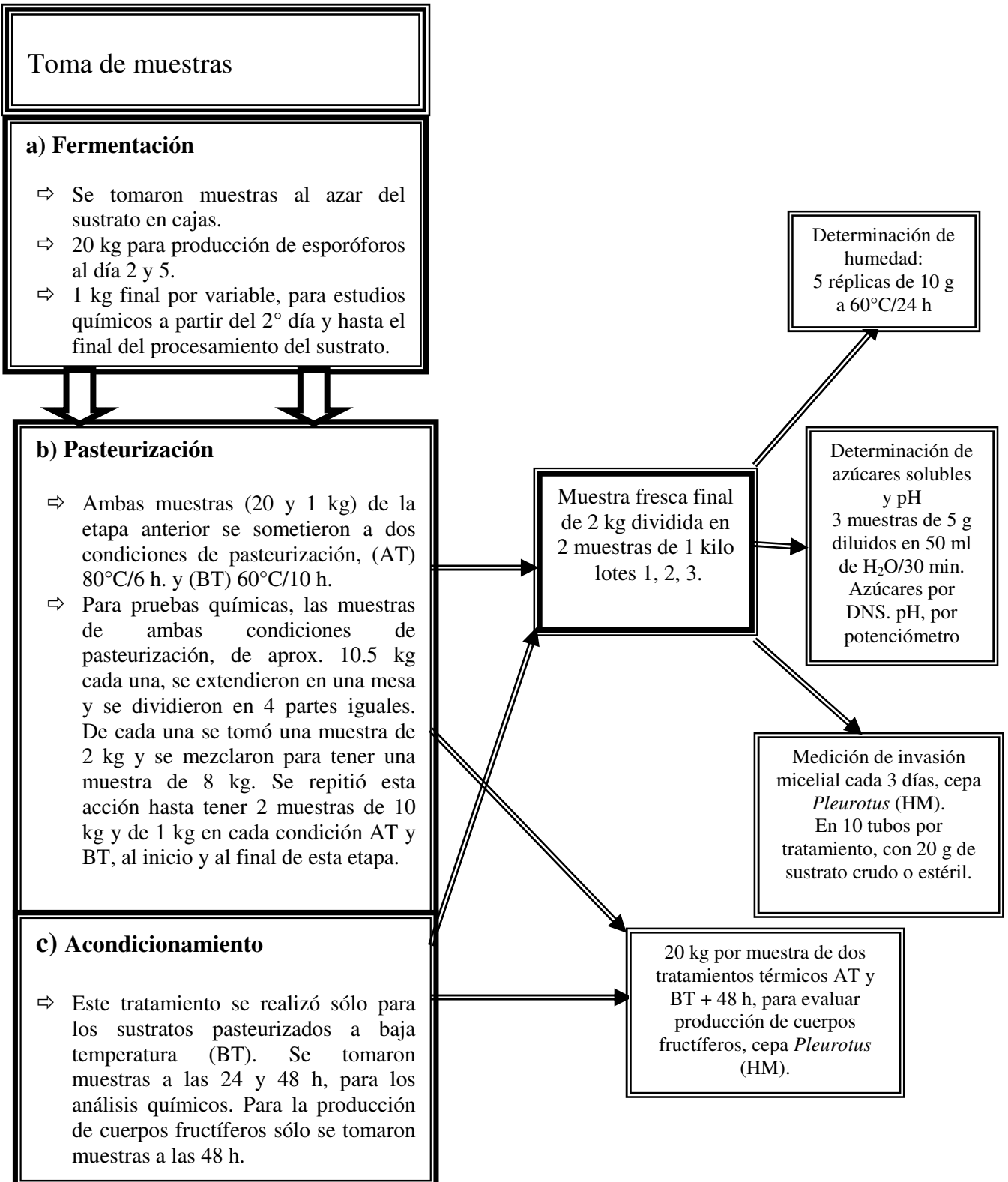
Figura 2. Esquema experimental para el procesamiento del sustrato a escala laboratorio (lotes 1, 2, 3).



* Día 5 equivale al llenado en la producción industrial

** Solo con 48 h de acondicionamiento

Figura 3. Obtención de muestras para evaluaciones químicas y biológicas a escala laboratorio.



6.3 MÉTODOS Y REACTIVOS.

Cabe mencionar, que las distintas evaluaciones y análisis químicos de los sustratos muestreados en los sistemas de producción a escala industrial y de laboratorio fueron semejantes. Excepto por las muestras que se utilizaron en los experimentos de producción de esporóforos, ya que en el proceso industrial sólo se tuvo acceso al sustrato para dicho objetivo, al final del procesamiento del sustrato.

6.3.1 Material biológico.

El inóculo (“semilla”), fue proporcionada por la empresa Hongos de México que utilizaba para su producción de setas la cepa de *Pleurotus* (HM), esta presenta características fisiológicas, morfológicas y organolépticas adecuadas para la producción comercial, como son: rápido crecimiento, gran adaptabilidad a una variedad de condiciones de crecimiento y de sustratos, desarrollo adecuado particularmente en temperaturas calidas.

6.3.2 Evaluación de crecimiento micelial y porcentaje de contaminación.

Las muestras de 1 kg se colocaron en una mesa de trabajo para mezclarlas y dividir las en dos partes iguales. Se tomó una de estas muestras de 500 g para dividirla nuevamente en dos partes iguales (250 g c/u), una de las cuales fue sometida a esterilización (1.05 kg/cm², 45 minutos). Posteriormente, se llenaron 10 tubos de plástico tipo pet (17.5 cm de alto x 3 cm de diámetro), cada uno con 20 g de sustrato estéril. Otros 10 tubos fueron llenados con 20 g de sustrato “crudo” (sin tratamiento). Finalmente, se inocularon los 20 tubos en una campana de flujo laminar, colocando 2.5 g de semilla de *P. ostreatus* con la cepa (HM) en la parte superior del tubo sobre la superficie del sustrato a modo de “tapón”. Los tubos se taparon con tapa rosca de plástico habilitada con 4 perforaciones de aproximadamente 1 mm \varnothing , distribuidas simétricamente y se colocaron en una estufa para incubarlos a 25°C en oscuridad. El crecimiento micelial se determinó midiendo su avance con un vernier a partir de la superficie del sustrato y hacia el fondo del tubo, considerando sobre la superficie del

tubo 4 posiciones en ángulo recto. Las mediciones y la presencia de contaminación, se registraron cada tercer día, durante 15 días (**Figuras 1 y 3**).

6.3.3 Determinaciones químicas.

El material sobrante de las muestras antes mencionadas (aproximadamente 500 g), se colocó sobre una mesa donde se mezcló y dividió en tres partes iguales. De cada una, se pesaron 5 g de sustrato crudo colocándose en un matraz Erlenmeyer de 200 ml y agregando 50 ml de agua destilada. Los tres matraces se agitaron a 60 rpm durante 30 minutos, se filtró la mezcla y del filtrado se realizaron los análisis de azúcares reductores (Método DNS) (Miller, 1959), y se determinó el pH con un potenciómetro (CONDUCTRONIC pH 120). El material restante de cada muestra se dividió en 2 partes iguales, una de las cuales se esterilizó (1.05 kg/cm²/45 minutos). De cada muestra (estéril y cruda) se pesaron 5 unidades de 10 g cada una para determinar el contenido de humedad, en una estufa a 60°C durante 24 h (**Figuras 1 y 3**).

6.3.4 Evaluación de la producción de cuerpos fructíferos.

La producción de cuerpos fructíferos se obtuvo, usando 10 bolsas de 2 kg de paja en peso húmedo por cada variable evaluada. A escala industrial se tomaron muestras sólo al final del procesamiento del sustrato, mientras que a nivel laboratorio se prepararon bolsas con los sustratos obtenidos a los 2 y 5 días de fermentación, con los sustratos pasteurizados a alta temperatura y baja temperatura + 48 h de acondicionamiento. Las unidades experimentales hechas con estos sustratos se prepararon colocando en una bolsa de polipapel transparente capas alternadas de sustrato con 5% de semilla de *P. ostreatus* con la cepa comercial (HM). Las bolsas se incubaron en oscuridad a 27.5°C, una vez invadido la totalidad del sustrato (25 a 30 días), se hicieron varias aberturas triangulares de aproximadamente 5 cm distribuidas alrededor de la bolsa. Las bolsas se colocaron en un cuarto de fructificación, con períodos alternados de 12 h de luz y oscuridad, a una temperatura de 23°C y ventilación continua de aire húmedo. Para evaluar la producción de hongos, una vez maduros se cortaron y pesaron, se tomaron en cuenta la totalidad de

esporóforos obtenidos en 2 ó 3 cortes por unidad experimental. Mediante observación periódica se determinó la presencia de contaminación en los sustratos (**Figuras 1 y 3**).

6.3.5 Análisis estadísticos.

Debido a la toma aleatoria de muestras en los dos ciclos de trabajo (lotes 4 y 5) a escala industrial, estos valores no fueron analizados estadísticamente. Exclusivamente los resultados obtenidos en los experimentos a nivel laboratorio (lotes 1, 2, 3) se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza y las pruebas de intervalo múltiple de Tukey y Duncan, con la ayuda del paquete estadístico SPSS versión 11.0.

Estas pruebas fueron aplicadas en las evaluaciones de desarrollo micelial, con los sustratos de 2 a 5 días de fermentación, bajo las 2 condiciones de pasteurización (alta y baja temperatura), adicionalmente con tratamiento (crudos vs estériles), y con los valores de los sustratos con 12 días de incubación. Las pruebas realizadas a los resultados de azúcares reductores, se obtuvieron analizando a los sustratos de 2 a 5 días de fermentación, bajo las dos condiciones de pasteurización a alta y baja temperatura, en estos últimos también a las 24 y 48 h de acondicionamiento. Por último, los resultados obtenidos de los sustratos con 2 y 5 días de fermentación, bajo las dos condiciones de pasteurización y acondicionamiento es su caso, utilizadas para los experimentos de producción de cuerpos fructíferos fueron consideradas para los análisis estadísticos (**Anexo**).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. ESTUDIO DEL PROCESO A ESCALA INDUSTRIAL DE PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.

En la parte inicial de esta investigación, se realizaron muestreos en dos ciclos de producción a escala industrial, clasificados por la empresa como lotes 4 y 5, lográndose identificar algunas de las condiciones y características que adquieren los sustratos utilizados para la producción industrial de *Pleurotus ostreatus*. En el lote 4, la fermentación se extendió por 5 días, mientras que en el lote 5 fue de 6 días. En ambos casos, la pasteurización-acondicionamiento se realizó en 4 días (**Figuras 4 y 5**).

7.1.1 Evaluación de crecimiento micelial.

Al evaluar el crecimiento micelial, se observó en los sustratos de ambos lotes un crecimiento vegetativo similar durante el período de fermentación y al final de la pasteurización. Los lotes 4 y 5, al final del acondicionamiento (3 y 4 días) incrementaron su invasión micelial, respecto a los resultados obtenidos en las etapas de fermentación-pasteurización (**Tablas 1 y 2; Figuras 6 y 8**). Cuando los sustratos de uno y otro lotes fueron sometidos a un proceso extra de esterilización, por una parte en los sustratos del lote 4, presentaron una mayor invasión micelial durante la fermentación que la mostrada en los sustratos “crudos” (sin esterilización) (**Tablas 1 y 2; Figuras 7 y 9**). Este comportamiento se invirtió una vez que los sustratos se sometían al proceso de pasteurización y acondicionamiento, durante estos períodos se presentó un mejor crecimiento micelial en los sustratos crudos. No obstante, entre los sustratos esterilizados de ambos lotes no se observaron diferencias importantes en el desarrollo vegetativo de *Pleurotus* a través de las diferentes etapas de tratamiento del sustrato (fermentación, pasteurización-acondicionamiento) (**Tablas 1 y 2; Figuras 7 y 9**).

Figura 4. Proceso de preparación de sustrato para *Pleurotus ostreatus* a escala industrial (lote 4).

PROCESO PREPARACIÓN DE SUSTRATO		MUESTREO Y DETERMINACIONES REALIZADAS				
ETAPA	OPERACIÓN	[]Azúcares	pH	H (%)	Evaluación de desarrollo micelial y de contaminación	
					Sustrato crudo	Sustrato estéril
FERMENTACIÓN	ROMPER + PISAR	✓	✓	✓		
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (1)					
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (2)					
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (3)	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (4)					
	↓					
VOLTEO CON AGUA (5)	✓	✓	✓	✓	✓	
PASTEURIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO	LLENADO Y PASTEURIZACIÓN (0)	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	(1 ^{er} día) ACONDICIONAMIENTO					
	↓					
	(2 ^o día) ACONDICIONAMIENTO					
	↓					
	(3 ^{er} día) ACONDICIONAMIENTO					
	↓					
(4 ^o día) ACONDICIONAMIENTO	✓	✓	✓	✓	✓	
↓						
SIEMBRA	INOCULACIÓN				✓	✓

Figura 5. Proceso de preparación de sustrato para *Pleurotus ostreatus* a escala industrial (lote 5).

PROCESO PREPARACIÓN DE SUSTRATO		MUESTREO Y DETERMINACIONES REALIZADAS				
ETAPA	OPERACIÓN	[]Azúcares	pH	H (%)	Evaluación de desarrollo micelial y de contaminación	
					Sustrato crudo	Sustrato estéril
FERMENTACIÓN	ROMPER + PISAR	✓	✓	✓		
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (1)					
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (2)					
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (3)	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (4)	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	VOLTEO CON AGUA (5)					
	↓					
PASTEURIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO	LLENADO Y PASTEURIZACIÓN (0)	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	(1 ^{er} día) ACONDICIONAMIENTO					
	↓					
	(2 ^o día) ACONDICIONAMIENTO					
	↓					
	(3 ^{er} día) ACONDICIONAMIENTO	✓	✓	✓	✓	✓
	↓					
	(4 ^o día) ACONDICIONAMIENTO	✓	✓	✓	✓	✓
↓						
SIEMBRA	INOCULACIÓN				✓	✓

Estos resultados se podrían explicar en el sentido que durante la fermentación los sustratos esterilizados posiblemente presentaron condiciones más favorables para un buen desarrollo micelial de *Pleurotus*, este tratamiento térmico asegura la eliminación de cualquier agente biológico antagonista o competitivo para el micelio de *Pleurotus*. Por otra parte, durante la pasteurización-acondicionamiento los sustratos adquieren condiciones más favorables para el crecimiento micelial de *Pleurotus*, ya que durante esta etapa, entre otras cosas, continúa el consumo de fuentes de carbono de fácil asimilación, tales como las azúcares simples, como resultado de metabolismo de diversas bacterias, mohos y actinomicetes que invaden el sustrato, así mismo se ha reportado que algunos de estos microorganismos podrían producir sustancias antagonistas a mohos contaminantes (Gray *et al.*, 1971; Fermor *et al.*, 1979; Schies y Lelley, 1989; Stölzer y Grabbe, 1991; Pardo-Núñez y García- Mendoza, 2002; Velázquez -Cedeño *et al.*, 2006 a, b).

Tabla 1. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* con la cepa (HM) en sustratos crudos ó estériles en diferentes etapas del proceso industrial (lote 4).

Etapa del proceso (días)	Sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
3	Estéril	1.4 ± 0.2	4.0 ± 0.4	6.2 ± 1.1	8.7 ± 1.8	11.4 ± 2.2
	Crudo	1.3 ± 0.3	2.5 ± 0.7	4.5 ± 1.1	7.2 ± 1.2	8.8 ± 1.5
5 (fin fermentación)	Estéril	1.7 ± 0.3	4.4 ± 0.4	7.6 ± 0.4	10.8 ± 0.5	13.0 ± 0.0
	Crudo	1.5 ± 0.5	3.7 ± 0.8	5.0 ± 0.8	6.8 ± 1.2	8.8 ± 1.6
Llenado y pasteurizado	Estéril	1.7 ± 0.3	4.7 ± 0.3	8.0 ± 0.3	11.0 ± 0.3	13.0 ± 0.0
	Crudo	1.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3	4.0 ± 0.5	5.6 ± 0.8	7.6 ± 1.2
4	Estéril	1.6 ± 0.3	4.7 ± 0.4	7.6 ± 0.4	10.5 ± 0.4	13.0 ± 0.0
	Crudo	1.7 ± 0.4	5.5 ± 0.3	8.7 ± 0.4	12.6 ± 0.7	13.0 ± 0.0

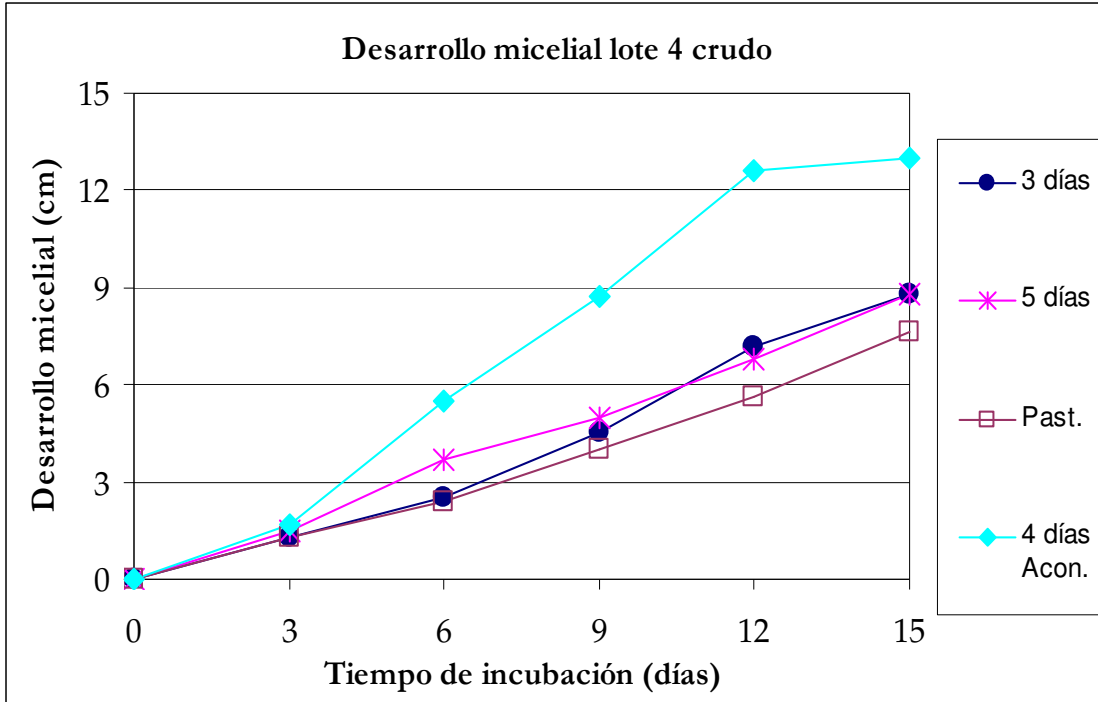


Figura 6. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos en diferentes etapas del proceso industrial (lote 4).

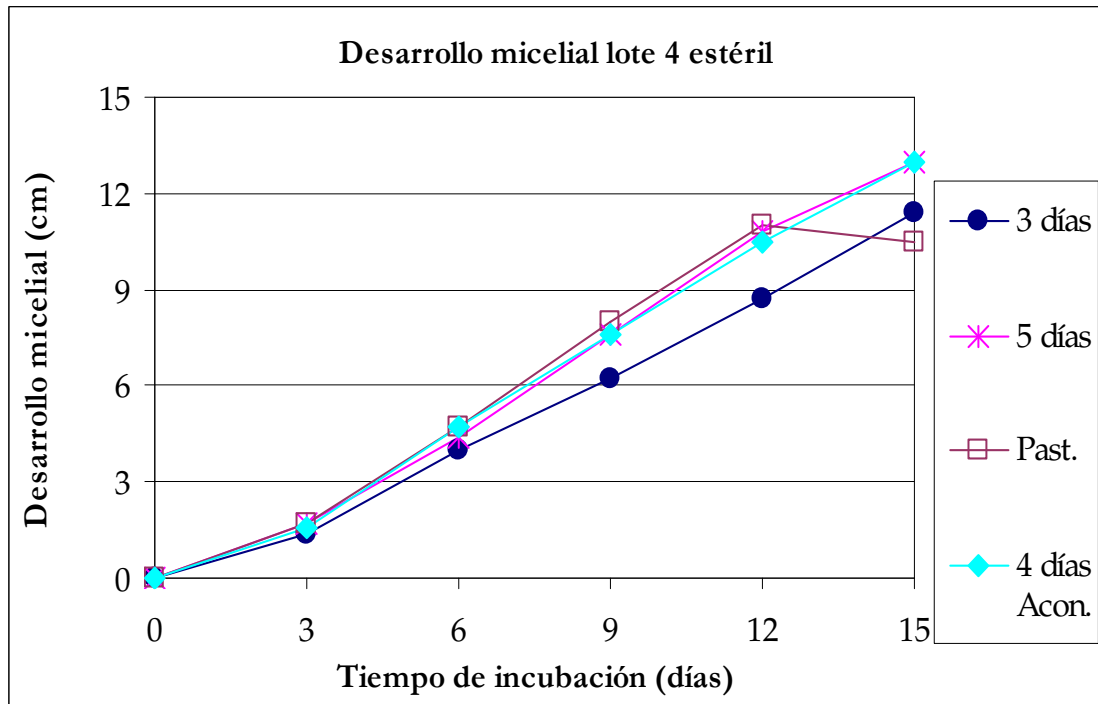


Figura 7. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos “estériles” en diferentes etapas del proceso industrial (lote 4).

Tabla 2 Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles en diferentes etapas del proceso industrial (lote 5).

Etapa del proceso (días)	Sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
3	*Estéril	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.4	4.8 ± 0.5	7.2 ± 0.6	9.3 ± 0.8
	Crudo	0.9 ± 0.3	2.5 ± 0.5	5.4 ± 0.6	8.1 ± 0.7	10.7 ± 0.8
4	*Estéril	1.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2	5.7 ± 0.4	8.5 ± 0.2	11.2 ± 0.1
	Crudo	0.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2	6.0 ± 0.4	8.8 ± 0.1
6 (fin fermentación)	Estéril	1.1 ± 0.2	3.5 ± 0.3	5.9 ± 0.3	8.4 ± 0.6	10.7 ± 0.5
	Crudo	1.0 ± 0.2	2.7 ± 0.3	4.3 ± 0.3	6.6 ± 0.5	8.7 ± 0.8
Llenado y pasteurizado	Estéril	1.6 ± 0.2	4.5 ± 0.4	7.4 ± 0.4	10.2 ± 0.5	12.4 ± 0.9
	Crudo	1.0 ± 0.1	3.1 ± 0.5	4.9 ± 0.6	7.0 ± 0.9	9.3 ± 1.0
3	Estéril	2.0 ± 0.3	5.1 ± 0.4	8.2 ± 0.4	10.7 ± 0.4	13.0 ± 0.0
	Crudo	2.1 ± 0.3	5.5 ± 0.4	8.4 ± 0.4	11.1 ± 0.4	13.0 ± 0.0
4	Estéril	1.7 ± 0.3	4.9 ± 0.3	7.8 ± 0.4	10.3 ± 0.3	13.0 ± 0.0
	Crudo	1.9 ± 0.3	5.4 ± 0.3	8.7 ± 0.5	11.5 ± 0.4	13.0 ± 0.0

*Muestras que presentaron un porcentaje de contaminación del 10%

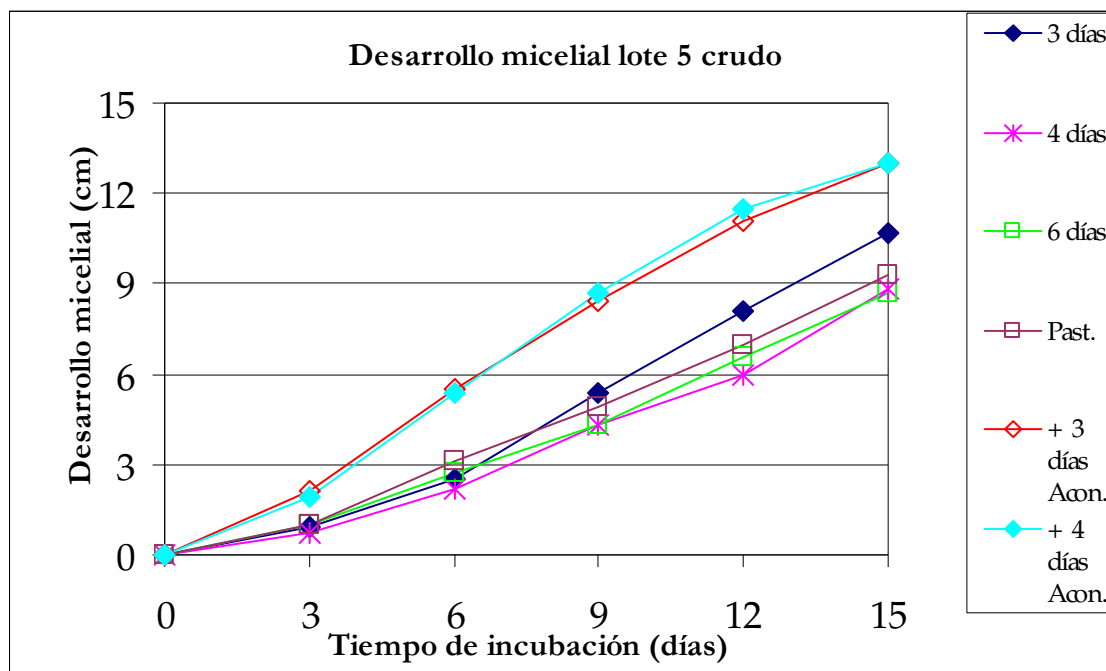


Figura 8. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos en diferentes etapas del proceso industrial (lote 5).

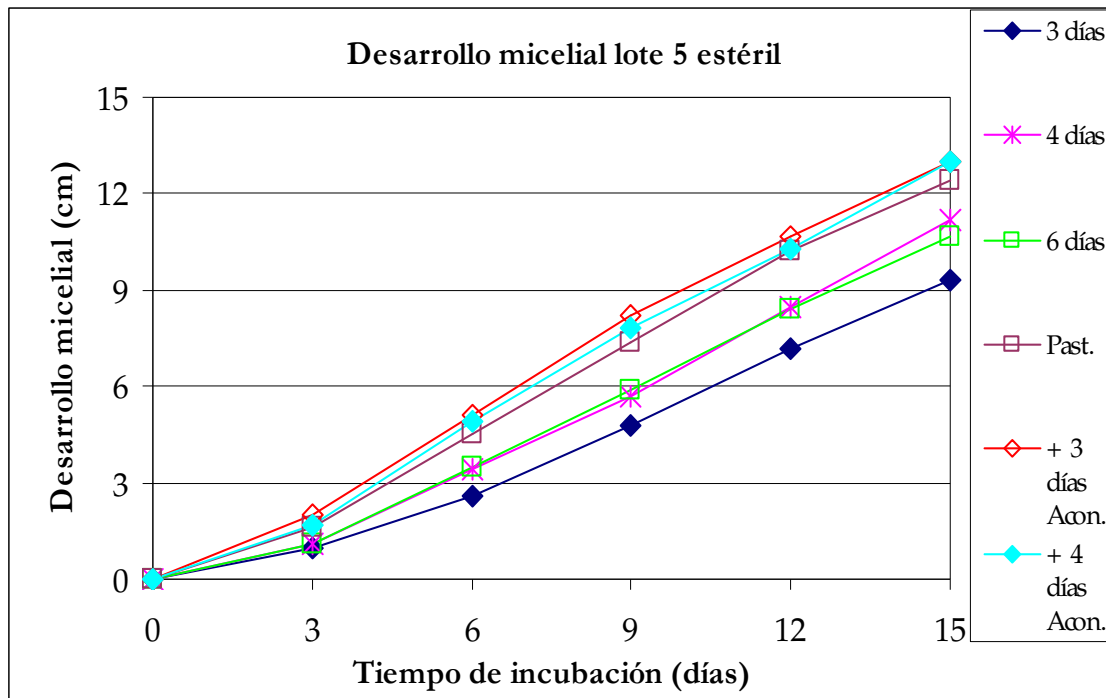


Figura 9. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos estériles en diferentes etapas del proceso industrial (lote 5).

7.1.2 Contaminación en el desarrollo micelial.

En cuanto a la presencia de contaminación durante los experimentos de crecimiento micelial, ésta se observó únicamente en el sustrato del lote 5, en las pajas sometidas a esterilización, a los 3 y 4 días de fermentación, con una incidencia del 10% ambos días (Tablas 1 y 2). Este fenómeno se podría explicar, por una parte como resultado de las temperaturas de esterilización que eliminarían tanto microorganismos benéficos como otros factores de naturaleza termosensible, que se producen en el sustrato durante la etapa de fermentación afectando así negativamente su selectividad. En este sentido Schies y Lelley (1989) indican que algunos productos metabólicos microbianos, representan una barrera al ataque de mohos contaminantes que posteriormente pierden su efectividad al extenderse la fermentación. Por lo que, después de la esterilización el sustrato es más susceptible a la

invasión de diversos organismos competidores o antagonistas que compiten por los recursos alimenticios de fácil asimilación del sustrato contra el micelio de *Pleurotus*.

7.1.3 Temperaturas en pilas de fermentación.

Las temperaturas registradas en las pilas de fermentación presentaron diferencias en ambos lotes. En el lote 4, los valores fluctuaron entre 58 a 62°C en la parte superior del cordón, mientras que en la parte interna la temperatura se mantuvo entre los 38 a 54°C al tercer y quinto día de fermentación, respectivamente (**Tablas 3**). En la pila de fermentación del lote 5, el sustrato no alcanzó una temperatura adecuada para que se llevara a cabo un proceso de fermentación efectivo, ya que los valores registrados oscilaron entre 31 a 40°C en la parte superior, mientras que en la parte interna los valores se mantuvieron alrededor de 32 a 35°C. Este fenómeno, probablemente se debió a que el cordón de fermentación no fue diseñado con las dimensiones apropiadas, lo suficientemente grande para lograr incrementar las temperaturas por acción del metabolismo de los diferentes microorganismos que invaden el sustrato. Por otra parte, durante la pasteurización-acondicionamiento las temperaturas del sustrato se conservaron constantes, por el riguroso sistema automatizado de inyección de vapor y aireación. Así la temperatura de pasteurización del sustrato fue de 58°C por 12 h y durante el acondicionamiento la temperatura se mantuvo a 45°C, por 3 1/2 días, en ambos lotes (**Tablas 3 y 4**).

7.1.4 pH y Humedad.

Respecto al pH, en el sustrato del lote 4 se registraron valores ligeramente básicos presentándose un incremento de 7.4 a 8 conforme avanzó la fermentación, pasteurización y acondicionamiento. En el sustrato del lote 5, se observó un pH menor comparado con el sustrato del lote 4 manteniéndose entre 7.1 a 7.4 durante los diferentes períodos del procesamiento (**Tablas 3 y 4**).

Tabla 3. Temperatura, humedad y pH de la paja, durante las diferentes etapas del procesamiento del sustrato (lote 4).

Etapa del proceso	Día		Temperatura en la pila (°C)	pH	Contenido de humedad del sustrato (%)	
					Crudo	Estéril
Fermentación	Paja seca			6.9	5	
	3	Interna	38.3 ± 10.4	7.4	77	76
		Superior	58.0 ± 6			
	5	Interna	54.0 ± 6.6	7.7	83	79
		Superior	62.5 ± 2.1			
	Pasteurización-Acondicionamiento	Llenado (0)	Interna	58.0 ± 0	7.9	79
Superior			58.0 ± 0			
4		Interna	45.0 ± 0	8.0	78	77
		Superior	45.0 ± 0			

Tabla 4. Temperatura, humedad y pH de la paja, durante las diferentes etapas del procesamiento del sustrato (lote 5).

Etapa del proceso	Día		Temperatura en la pila (°C)	pH	Contenido de humedad del sustrato (%)	
					Crudo	Estéril
Fermentación	Paja seca			6.9	5	
	3	Interna	35.5 ± .5	7.1	70	68
		Superior	40.0 ± 0			
	4	Interna	32.3 ± 8.9	7.3	73	71
		Superior	31.9 ± 10.2			
	6	Interna	33.9 ± 3.8	7.2	75	71
		Superior	35.1 ± 3.6			
	Pasteurización-Acondicionamiento	Llenado (0)	Interna	58.0 ± 0	7.1	79
Superior			58.0 ± 0			
3		Interna	45.0 ± 0	7.6	80	79
		Superior	45.0 ± 0			
4		Interna	45.0 ± 0	7.4	76	76
		Superior	45.0 ± 0			

La humedad en el sustrato registró pequeñas diferencias entre ambos lotes durante la etapa de fermentación; esta osciló del 77 a 83% en el lote 4, mientras que en el lote 5, los valores obtenidos fluctuaron entre el 70 a 75% durante este período. Al final de la pasteurización los sustratos de ambos lotes presentaron valores similares, de 79 y 75% en los materiales crudos y estériles, respectivamente. Durante el acondicionamiento, sólo fue posible analizar las muestras del día 3 del lote 5, éstas presentaron un 80% de humedad, pero al final de este tratamiento térmico el contenido de humedad en los sustratos en ambos lotes nuevamente se niveló en el intervalo de 76 a 78%. En los lotes 4 y 5, el proceso de esterilización de los sustratos provocó una disminución en la humedad entre 1 al 4% en las diferentes condiciones de procesamiento (**Tablas 3 y 4**).

7.1.5 Azúcares reductores.

El contenido de azúcares reductores en los sustratos de los lotes 4 y 5, exhibieron valores con algunas diferencias entre sí, aunque la tendencia observada fue una disminución en la concentración de azúcares al avanzar el período de fermentación, para posteriormente presentar un incremento considerable durante la pasteurización-acondicionamiento. En el lote 4, la concentración de azúcares en los sustratos del día 3 de fermentación fue de 1171 mg/kg, incrementándose al día 5 a 1308 mg/kg reduciéndose al término de la pasteurización a 1112 mg/kg y aumentando nuevamente a 1972 mg/kg al final del acondicionamiento. En los sustratos del lote 5 se observó un incremento considerable en la concentración de azúcares al día 3 de fermentación con un valor de 2343 mg/kg para posteriormente reducirse gradualmente hacia el final de la fermentación, a 1406 mg/kg, y finalmente volverse a incrementar los últimos 3 y 4 días del acondicionamiento a valores de alrededor de 2000 mg/kg (**Tabla 5**).

Este fenómeno podría atribuirse a la presencia de microorganismos. La actividad metabólica de estos microorganismos podría por una parte explicar la disminución en el contenido de azúcares de fácil asimilación observada durante la fermentación. Tal sucesión de microorganismos continuaría durante el acondicionamiento. Posteriormente se presentarían aquellos capaces de desdoblar grandes moléculas como polisacáridos con la

consecuente generación de monosacáridos, estos incrementos en las concentraciones de azúcares simples posiblemente servirán como recursos alimenticios tanto para el crecimiento micelial de *Pleurotus*, como para el desarrollo de organismos contaminantes.

7.1.6 Producción de cuerpos fructíferos.

En la **Tabla 6**, se muestra la producción de cuerpos fructíferos obtenidos con los sustratos de los lotes 4 y 5. Es de hacer notar que aun y cuando el desarrollo micelial de ambos lotes al final de la etapa de acondicionamiento presentó valores parecidos. Al momento de realizar los experimentos de producción de esporóforos, el sustrato del lote 5 produjo una mayor cantidad de hongos comparado con el lote 4 (**Tabla 6**).

Tabla 5. Azúcares reductores en el sustrato (mg/kg sustrato seco) durante las diferentes etapas del procesamiento (lotes 4 y 5).

Período de tratamiento del sustrato	Día	Concentración del sustrato	
		lote 4	lote 5
	Paja seca	1504 ± 77	1504 ± 77
Fermentación	3	1171 ± 76	2343 ± 88
	4		1593 ± 92
	5	1308 ± 85	
	6		1406 ± 83
Pasteurización y Acondicionamiento	Llenado (0)	1112 ± 80	970 ± 79
	3		2063 ± 96
	4	1972 ± 92	1884 ± 88

El sustrato del lote 5, presentó un rendimiento de 115.9 (g hongos frescos/100 g de sustrato seco) al primer brote, valor semejante al conseguido por el lote 4 en su producción acumulada de 4 brotes 115.5 (g hongos frescos/100 g de sustrato seco). En este sentido, el sustrato del lote 5 presentó una producción acumulada final de 146 (g hongos frescos/100 g de sustrato seco) en tres brotes. En ninguno de los sustratos de ambos lotes se presentaron contaminaciones durante esta etapa (**Tabla 6**).

Tabla 6. Producción acumulada de esporóforos (g de hongos frescos/ 100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustrato pasteurizado (lotes 4 y 5).

Brotos	lotes	
	4	5
1	77.6 ± 10.8	115.9 ± 11.3
2	96.1 ± 12.4	139.5 ± 14.1
3	107.8 ± 13.6	146.0 ± 16.6
4	115.5 ± 12.7	

La información obtenida en esta etapa inicial de la investigación resultó de gran valor. En ambos lotes se observó un alto nivel de selectividad en el sustrato, ya que se detectó un bajo porcentaje de contaminación en las evaluaciones de crecimiento micelial y una ausencia total de contaminantes en los sustratos llevados a producción de esporóforos. Los rendimientos fueron bastante aceptables en ambos lotes, no obstante, fue imposible precisar las condiciones que produjeron tal nivel de selectividad en cada uno de los 2 lotes investigados, observándose una gran variación en los parámetros del proceso tales como tamaño de los cordones de fermentación, temperaturas, tiempo de fermentación, volteos, humedad y pH.

Aunado a lo anterior, se enfrentaron distintas dificultades que limitaron seriamente la obtención de información detallada de las condiciones de procesamiento. Por una parte, en la empresa no se empleaba una metodología “estandarizada” en la preparación del sustrato. Por ello, las variaciones tan marcadas en las condiciones utilizadas para los 2 lotes, tanto en las dimensiones de los cordones de fermentación (montones), como en los regímenes de riegos y volteos, lo cual posiblemente afectó el proceso de fermentación y por lo tanto la evolución de las temperaturas. Es decir que en la empresa se tomaban decisiones con un alto grado de empirismo para modificar la duración tanto de la fermentación, así como de la pasteurización-acondicionamiento, debidas en ocasiones como un ajuste a las variaciones en el comportamiento de un lote a otro o bien a las condiciones de operación de la empresa.

Una dificultad adicional, fue que la empresa limitó el acceso para llevar un registro continuo de los parámetros del tratamiento y toma de muestras del sustrato durante las diferentes etapas del procesamiento. Sin embargo, la información obtenida en esta etapa inicial permitió determinar algunos cambios que se presentan en el sustrato durante las diferentes etapas del proceso.

Estos resultados hacían evidente que la definición de un método que permita producir sustratos selectivos para *P. ostreatus* difícilmente podría ser establecida dando seguimiento a los métodos de producción en plantas industriales, ya que bajo estas circunstancias por diversas razones, resulta sumamente difícil controlar las condiciones del proceso. Una alternativa viable ante esto, consistía entonces en el montaje a escala laboratorio de un sistema que permitiera simular las condiciones que imperaron en las diferentes etapas de preparación del sustrato, la fermentación al aire libre y la pasteurización- acondicionamiento a escala industrial.

Es importante mencionar que adicionalmente a las condiciones encontradas en el estudio preliminar a escala industrial, existen pocos reportes en la literatura que fueron tomados en cuenta para diseñar un modelo de preparación del sustrato. La información reportada en la literatura, en términos generales, no es concluyente para definir las características y condiciones adecuadas de las diferentes etapas de preparación del sustrato. Schies y Lelley (1989) encontraron que *P. ostreatus* crece bien en paja fermentada, sumergiéndola en agua por 7 ó 14 días, pero sí la fermentación se extendía a 21 días se promovía el desarrollo de *Trichoderma hamatum*. Estos autores sugieren que el sustrato adquiere un mecanismo de defensa antifúngica durante los primeros 14 días de fermentación a través de la generación de sustancias que inhiben selectivamente el desarrollo micelial de *Trichoderma*, pero no el de *Pleurotus*.

En otros experimentos Stölzer y Grabbe (1991) demostraron que los tratamientos térmicos tienen una influencia decisiva sobre la selectividad del sustrato. La pasteurización a 75 y 85°C permitía el crecimiento tanto de hongos contaminantes como de *Pleurotus* y sólo el tratamiento a 65°C producía un sustrato que suprimía casi todos los hongos contaminantes

y permitía el crecimiento de *Pleurotus*. Durante la fermentación a 65°C, observaron un rápido desarrollo de bacterias termófilas y propusieron que algunas de estas bacterias aisladas de la paja de trigo son capaces de suprimir hongos contaminantes sin afectar el micelio de *Pleurotus*. Concluyendo así que la pasteurización de la paja a altas temperaturas provocaba una mayor liberación de azúcares como glucosa, que permite el fácil desarrollo de contaminantes; ya que si bien la paja tratada a 65°C también presentaba un aumento en la liberación de azúcares, después de 24 h eran completamente metabolizados por bacterias termófilas.

Villa Cruz *et al.*, (1999) proponen la producción de sustratos sin la necesidad de una etapa de pasteurización a alta temperatura o de la aplicación de funguicidas para eliminar organismos contaminantes, e indican que para obtener estos sustratos sólo se requiere apilarlos con una humedad del 70% por períodos de 5, 7 y 9 días, con volteos cada 24 h. Por otra parte Huerta-Palacios y González, (2000) encontraron altas eficiencias biológicas (121%) usando una mezcla de pasto pangola (*Digitaria decumbens*) (70%), con pulpa de café (28%) y 2% de Ca (OH)₂, fermentándola al aire libre por 5 a 7 días. No obstante, las condiciones y procesos que se llevaron a cabo para la obtención de dichos sustratos son poco claros.

Hernández *et al.*, (2003) coinciden en que las transformaciones que ocurren durante la etapa de fermentación a cielo abierto o composteo son de gran importancia ya que se reducen los niveles de microorganismos competitivos en el sustrato preparado. Los microorganismos nativos metabolizan diversos compuestos incluyendo azúcares, generando calor durante este proceso, alcanzando temperaturas de 50 a 70°C por varios días. El tiempo de fermentación es un factor crítico, como ya lo habían estudiado Philippoussis *et al.*, (2001) que encontraron buenas eficiencias biológicas con dos cepas de *Pleurotus* cultivadas en paja estéril, la cual disminuía sí la paja se composteaba por períodos de 12 días.

Pardo-Núñez *et al.*, (2002) reportaron que al fermentar paja sumergiéndola en agua por 6 a 7 días a 25°C, se observaba en la paja la presencia de diversas colonias de bacterias. Los

autores sugieren que las bacterias crecen y consumen rápidamente los carbohidratos de fácil asimilación, adicionalmente estos microorganismos pueden producir antibióticos y polisacáridos los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos competitivos y contaminantes.

7.2 MONTAJE A ESCALA LABORATORIO DE LAS CONDICIONES PARA LA PREPARACIÓN DE SUSTRATOS SELECTIVOS.

Con base en los resultados obtenidos en la etapa a escala industrial y los antecedentes bibliográficos, se planteó la necesidad de establecer un sistema de preparación del sustrato, que permitiera dar seguimiento a las características que adquiere la paja de trigo empleada como sustrato durante las etapas de fermentación, pasteurización- acondicionamiento. La fermentación a cielo abierto es un proceso trascendental en la elaboración de sustratos, como se confirmó en la etapa inicial de esta investigación, sin embargo, la mayoría de los productores utilizan criterios empíricos para establecer la duración y condiciones de este procedimiento. Ésto generalmente repercute en pérdida de tiempo, dinero y esfuerzo, resultando a largo plazo infructuosos.

Los resultados de la etapa anterior en la planta industrial y la información publicada por Schies y Lelley (1989), Huerta-Palacios y González (2000) Hernández *et al.*, (2003), Shim (2002) y Choi (2004), permitieron inferir las posibles condiciones de temperatura y tiempos que deben emplearse para esta etapa del tratamiento del sustrato. Por ello, se decidió someter la paja de trigo a una fermentación por 5 días, con una temperatura constante de 50°C desde el inicio. Se tomaron muestras diariamente a partir del segundo día y hasta el final del proceso, para tener un seguimiento preciso del sustrato y poder identificar las condiciones y tiempos de fermentación asociadas a la producción de sustratos selectivos.

No obstante, que las condiciones de pasteurización del sustrato tienen una relevancia significativa en los procesos de producción de hongos, la duración y temperaturas utilizadas para este propósito no están determinadas claramente. Para evaluar los cambios que ocurren en el sustrato durante esta etapa, se aplicaron dos distintas temperaturas de pasteurización.

Uno de “baja temperatura” (BT), a 60°C por 10 h, con el cual se eliminan las estructuras biológicas que permiten sobrevivir a la mayoría de la microflora y microfauna nociva (huevos y larvas de insectos, nematodos, ácaros, etc.). Por otro lado, a esta temperatura sobrevive la mayoría de la microflora termofila benéfica (bacterias) para el cultivo (ver Stölzer y Grabbe, 1991; Velázquez -Cedeño *et al.*, 2006 a, b), cuya actividad es importante ya que posiblemente se producen algunos metabolitos que brindan selectividad al desarrollo de *Pleurotus* y además consumen los azúcares de fácil asimilación que pueden ser fuente de alimento para los microorganismos contaminantes o antagonistas durante la incubación.

A los sustratos sometidos a pasteurización de (BT), se aplicó un proceso extra de acondicionamiento durante 48 h a 50°C, en contraste con los 4 días de fermentación que se aplicaban a nivel industrial. En los dos lotes estudiados a escala industrial, al final de la etapa de acondicionamiento se observó un incremento en la concentración de azúcares reductores, lo que eventualmente afectó la selectividad de los sustratos. Se decidió por ello no utilizar períodos tan largos de acondicionamiento, ya que al disminuir el tiempo de acondicionamiento, probablemente se podría reducir la concentración de azúcares en el sustrato con lo que se lograría también una economía en el proceso de producción, repercutiendo en un mejor sustrato y mayor eficiencia del proceso.

El otro tratamiento de pasteurización utilizado fue de “alta temperatura” (AT), a 80°C por 6 h. A pesar de que Stölzer y Grabbe (1991) indican que en los sustratos tratados en este intervalo de temperaturas se desarrolla tanto el micelio de *P. ostreatus* como diversos microorganismos contaminantes, existen algunos productores que reportan el uso exitoso de esta temperatura de pasteurización. Se decidió entonces evaluar este tratamiento por que a esta temperatura se logra en principio eliminar todo tipo de microorganismos o estructuras biológicas en el sustrato, adicionalmente todo el tratamiento se completa en solo 6 h, por lo que podría realizarse en condiciones mucho más sencillas que el anterior, y probablemente a costos más bajos, lo que resultaría muy interesante para los pequeños productores. Ambos tratamientos de pasteurización se aplicaron a sustratos sometidos a un período de fermentación de 50°C por 2, 3, 4 y 5 días. De esta manera fue posible comparar

el efecto que tienen los dos tratamientos térmicos sobre la susceptibilidad a la contaminación del sustrato.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE EXPERIMENTOS A ESCALA LABORATORIO (LOTES 1, 2, 3).

Siguiendo el esquema experimental planteado en la **Figura 2**, se prepararon sustratos en tres ocasiones consecutivas, denominados lotes 1, 2, 3. Los sustratos de los 3 lotes se sometieron a las mismas condiciones de temperatura, humedad, volteos y tiempo de tratamiento (5 días de fermentación), con dos condiciones de pasteurización alta y baja temperatura, esta última con un período extra de 48 h de acondicionamiento.

Los valores de los resultados obtenidos durante estos experimentos para los 3 lotes, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza para un diseño factorial y en los casos donde se observaron diferencias significativas o altamente significativas se utilizaron las pruebas de Tukey y/o Duncan. Estos análisis fueron aplicados en las evaluaciones de desarrollo micelial en los sustratos con 12 días de incubación, para observar las diferencias entre los sustratos de 2 a 5 días de fermentación, bajo las 2 condiciones de pasteurización alta y baja temperatura, crudos y estériles. Los resultados de azúcares reductores, se obtuvieron analizando los sustratos pasteurizados a alta y baja temperatura más 24 y 48 h de acondicionamiento, y durante el período de fermentación de 2 a 5 días. Por último, únicamente los sustratos con los tiempos de fermentación (2 y 5 días), fueron utilizados en la producción de esporóforos y considerados para los análisis estadísticos (**Anexo**).

En estos experimentos se observó que los lotes 2 y 3 presentaron resultados muy parecidos entre sí, mostrando diferencias significativas respecto al lote 1, esto se confirmó al realizar los análisis estadísticos correspondientes (**Anexo**).

7.3.1 Desarrollo micelial.

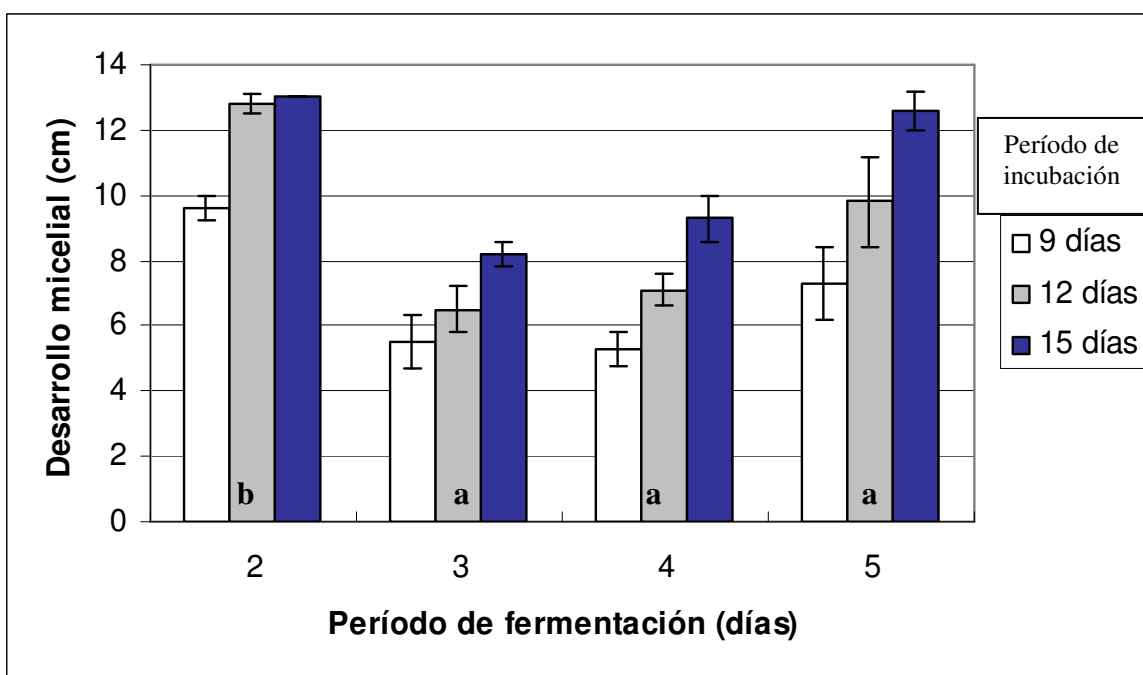
Con el lote 1, en los sustratos pasteurizados a BT se observó que con 2 días de fermentación el desarrollo micelial fue significativamente mayor ($\alpha=0.05$.) que el obtenido con 3, 4 y 5 días. Esta tendencia se mantuvo a los 9, 12 y 15 días de incubación (**Figura 10, Tablas 29, 38 y 39 Anexo**). Por otra parte, contrario a lo observado en los sustratos con una pasteurización de BT, los sustratos pasteurizados con AT presentaron un desarrollo micelial semejante en los sustratos fermentados por 2, 3 y 4 días. No obstante, en este caso al aumentar el período de fermentación a 5 días, el crecimiento vegetativo disminuyó significativamente, tendencia que se mantuvo con 9, 12 y 15 días de incubación (**Figura 11; Tablas 30, 38 y 39 Anexo**).

Los sustratos elaborados bajo las condiciones arriba indicadas fueron “esterilizados” e inoculados con *P. ostreatus* para evaluar la eventual presencia de un factor termosensible que influyera sobre la selectividad del sustrato. La tendencia previamente observada no se modificó al esterilizar los sustratos pasteurizados a BT, es decir el crecimiento micelial al fermentar el sustrato por 2 días fue significativamente mayor que cuando se fermentó por 3, 4 ó 5 días (**Figura 12; Tablas 29, 38 y 39 Anexo**). Adicionalmente, se observó un aumento significativo en la invasión micelial al esterilizar los sustratos con 3 y 4 días de fermentación respecto a los sustratos no esterilizados (**Tablas 29, 30, 38 y 39 Anexo**).

En el caso de los sustratos pasteurizados a AT, al esterilizarlos se encontró una modificación a lo observado previamente, ya que el desarrollo vegetativo de *P. ostreatus* en este caso fue similar con 2, 3 y 5 días de fermentación pero resultó significativamente mayor a los 4 días de fermentación, tendencia que se mantuvo con 9 y 12 días de incubación (**Figura 13; Tablas 30, 38 y 39 Anexo**). Cabe mencionar, que contrario a lo encontrado en los sustratos pasteurizados a BT, al esterilizar los sustratos pasteurizados a AT, el desarrollo micelial fue significativamente menor con 2, 3 y 5 días de fermentación

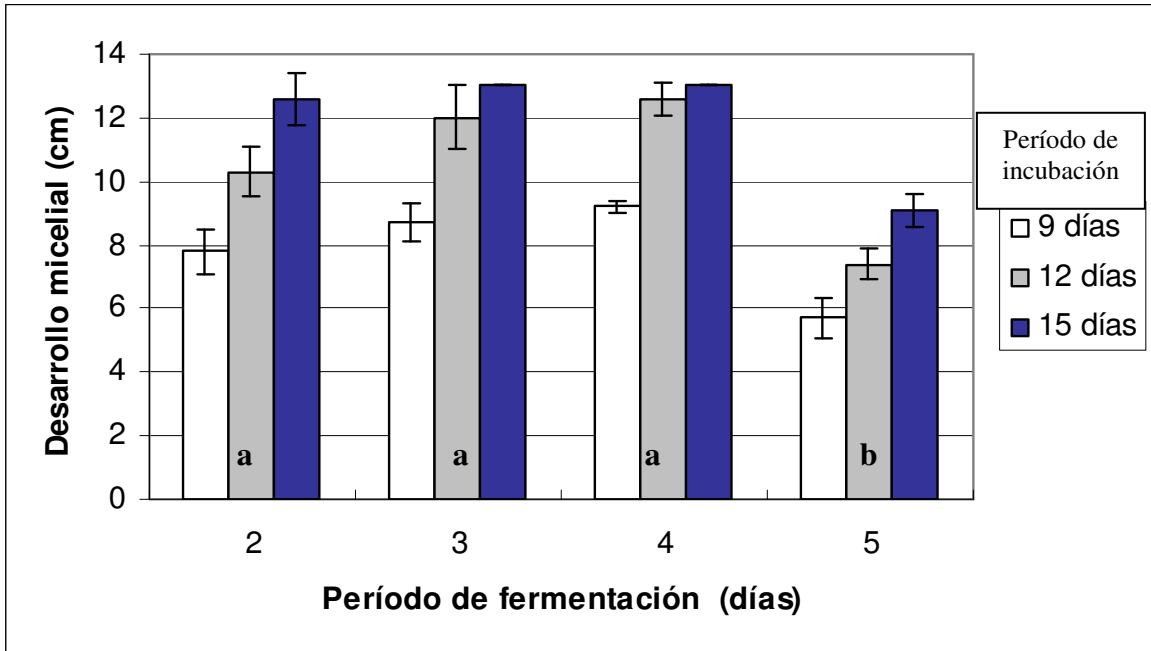
respecto a los sustratos no estériles. Entre los sustratos crudos y estériles con 4 días de fermentación no se observaron diferencias significativas (**Tablas 30, 38 y 39 Anexo**).

En contraste con los resultados obtenidos en el lote 1, en los lotes 2 y 3, no se detectaron diferencias significativas en el desarrollo vegetativo independientemente de los días de fermentación, y entre los sustratos pasteurizados a BT o AT. Se presentó una sólo excepción, el caso del sustrato fermentado por 5 días y pasteurizado a BT del lote 2, que mostró un desarrollo vegetativo significativamente menor que el resto de las condiciones (**Figuras 14, 15, 18, 19; Tablas 31, 32, 33, 34, 40, 41 y 42 Anexo**).



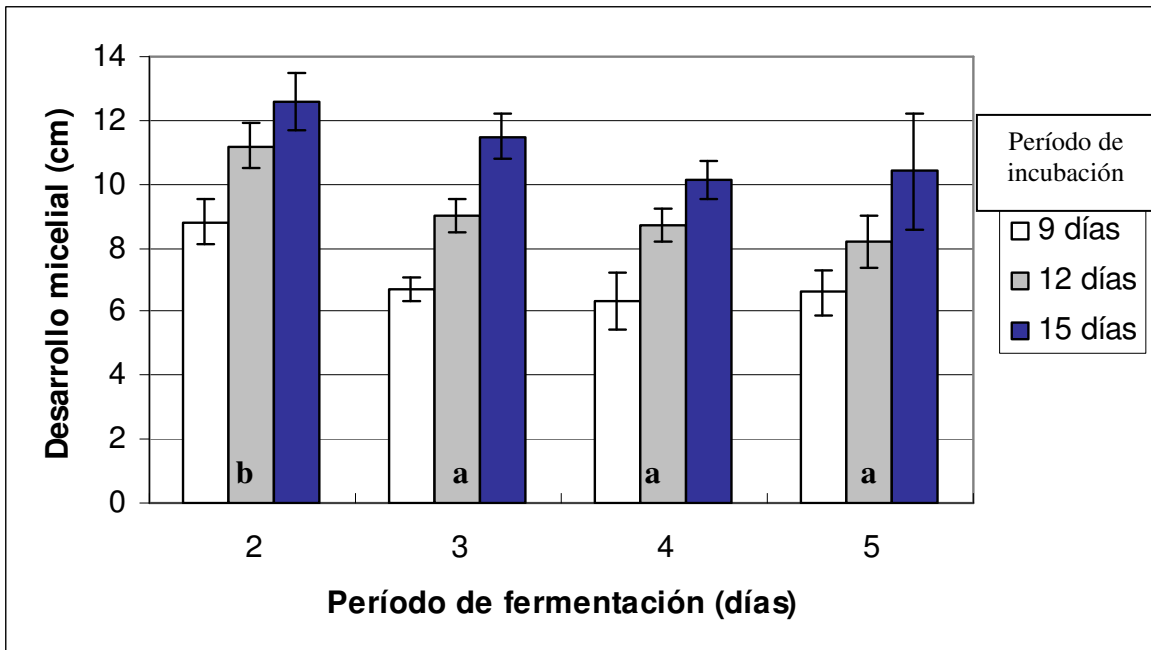
^{a,b} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 10. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 1).



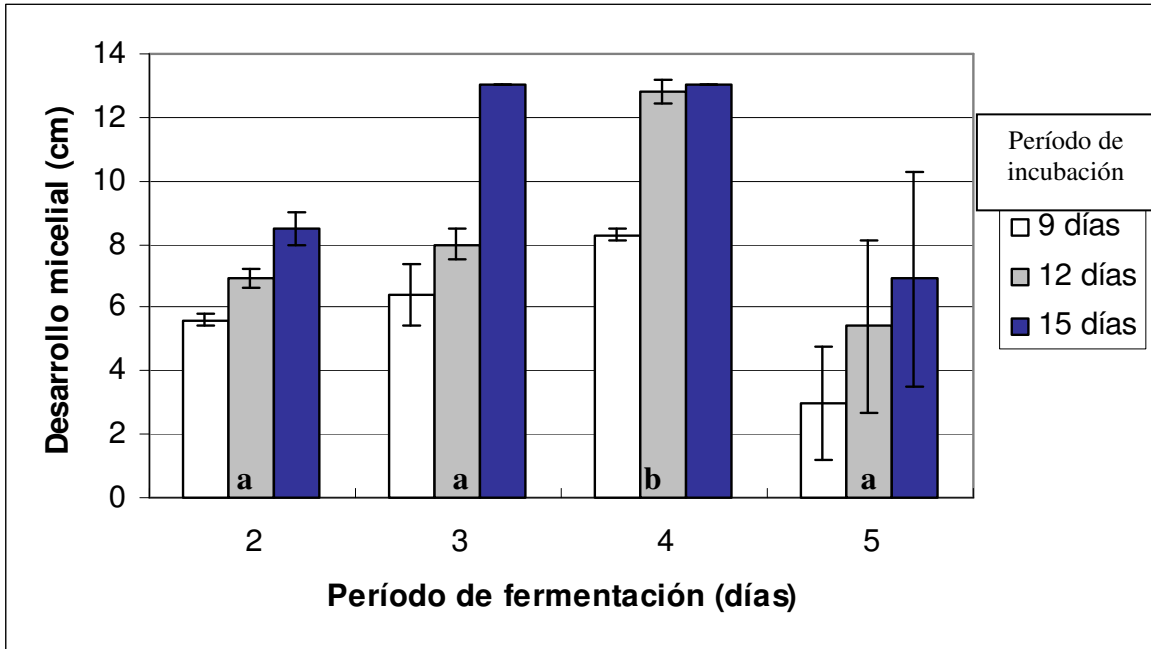
^{a,b} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 11. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 1).



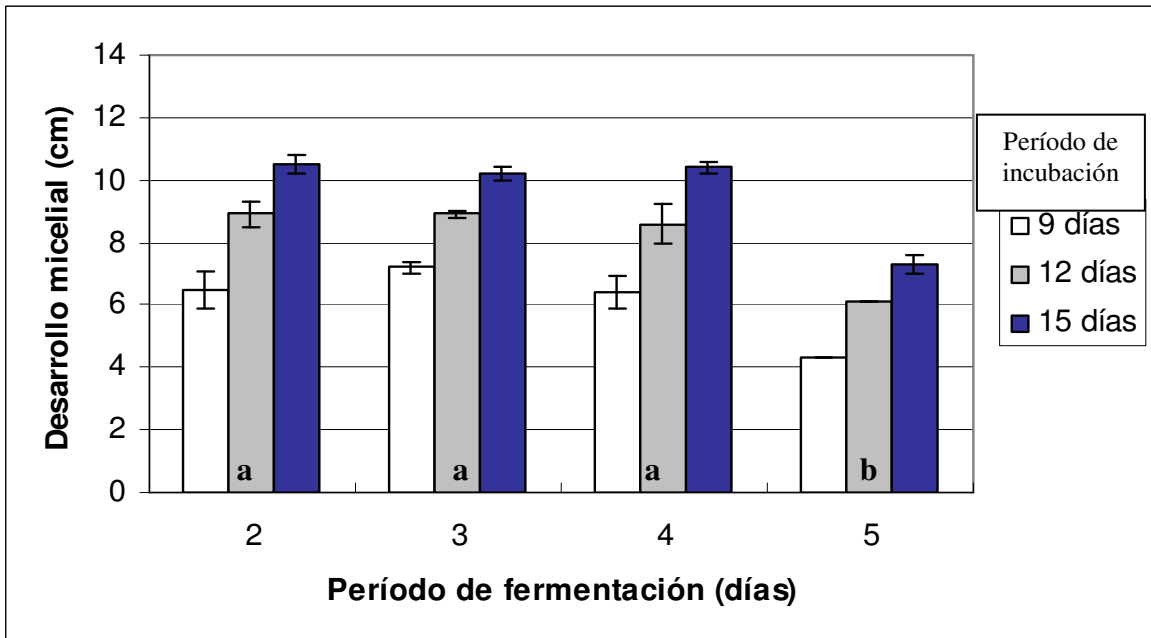
^{a,b} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 12. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 1).



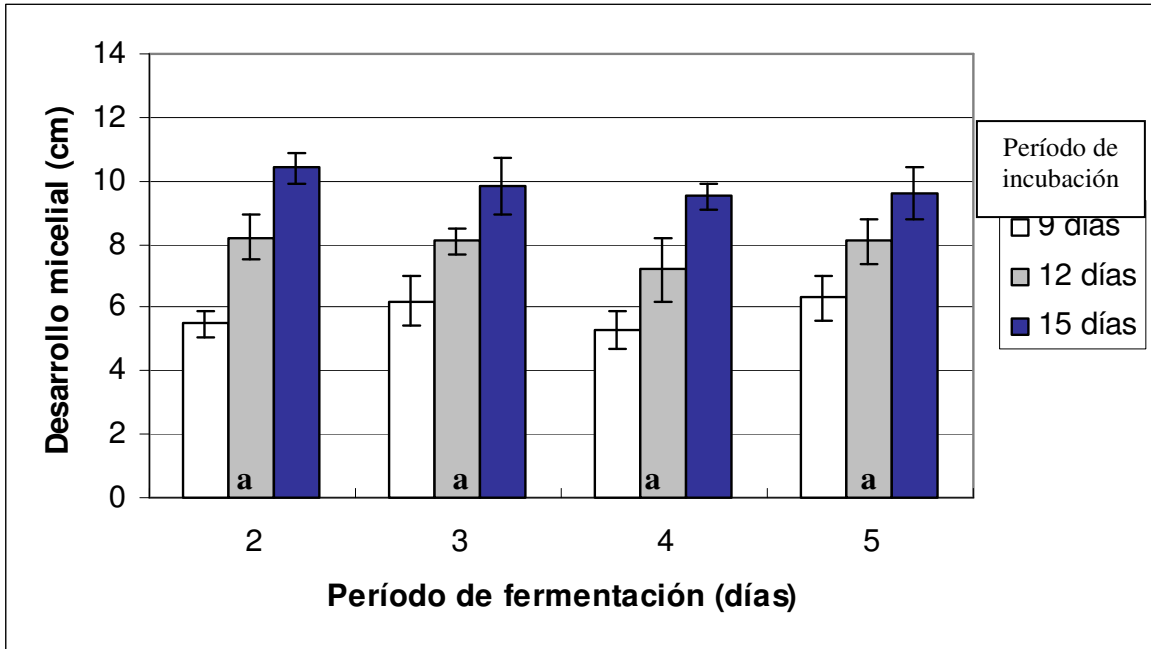
^{a,b} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05).

Figura 13. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 1).



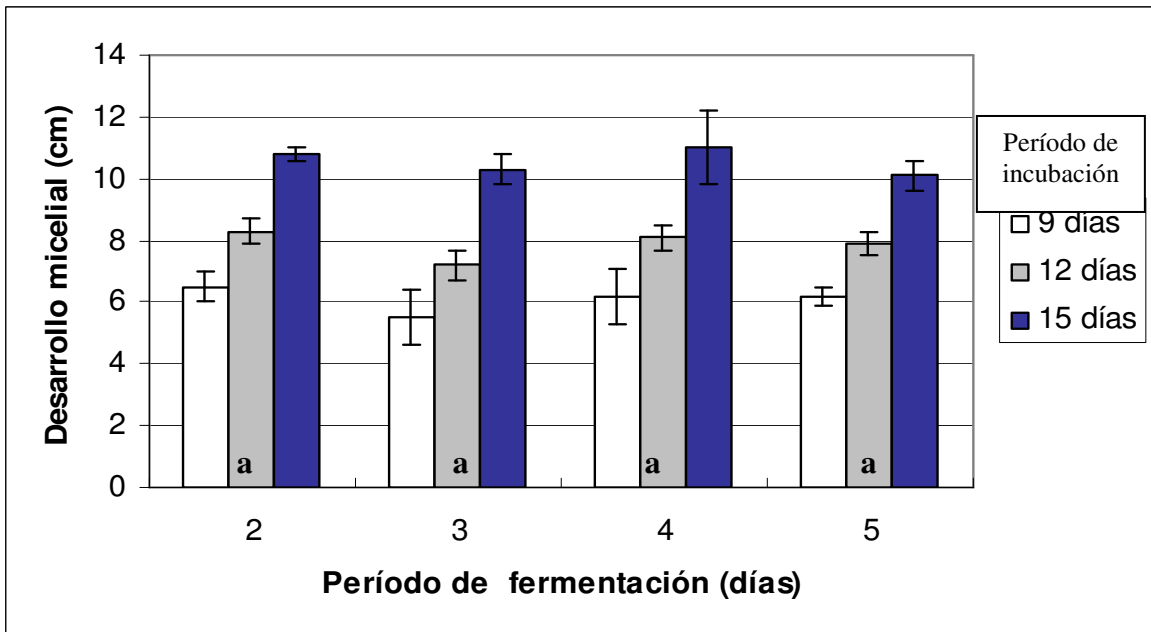
^{a,b} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05).

Figura 14. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 2).



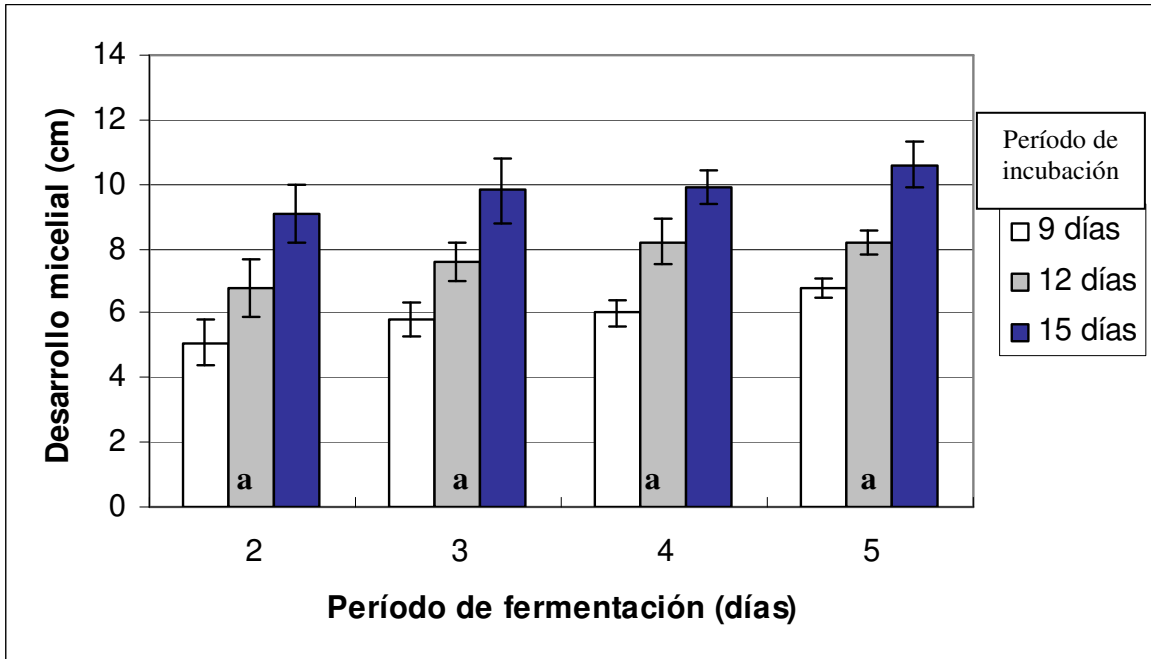
^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 15. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 2).



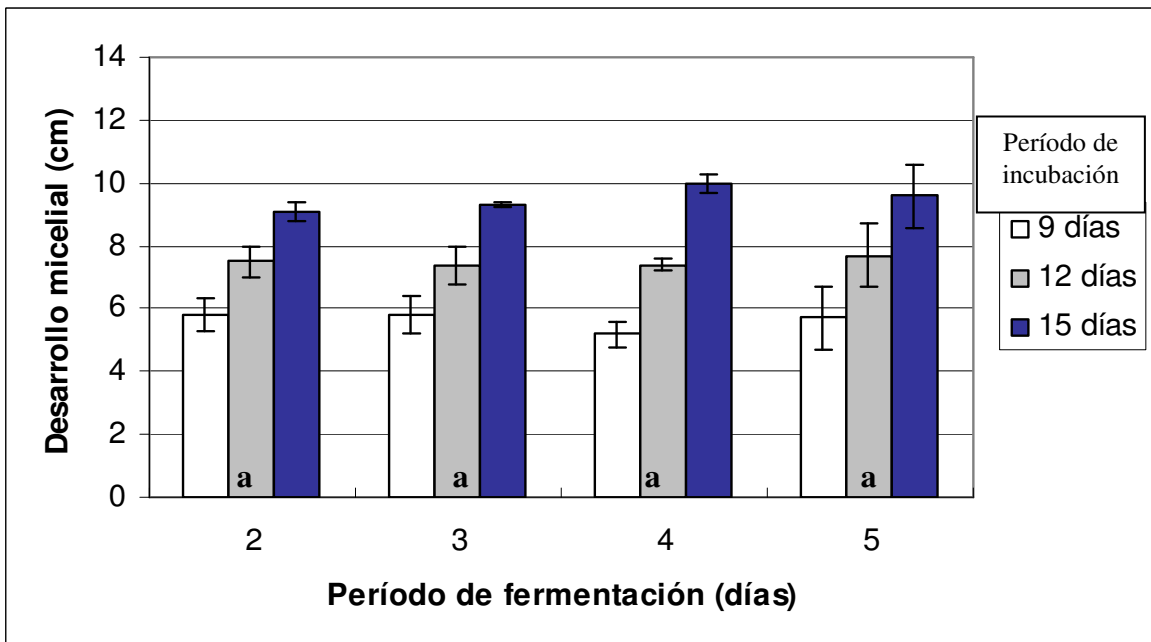
^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 16. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 2).



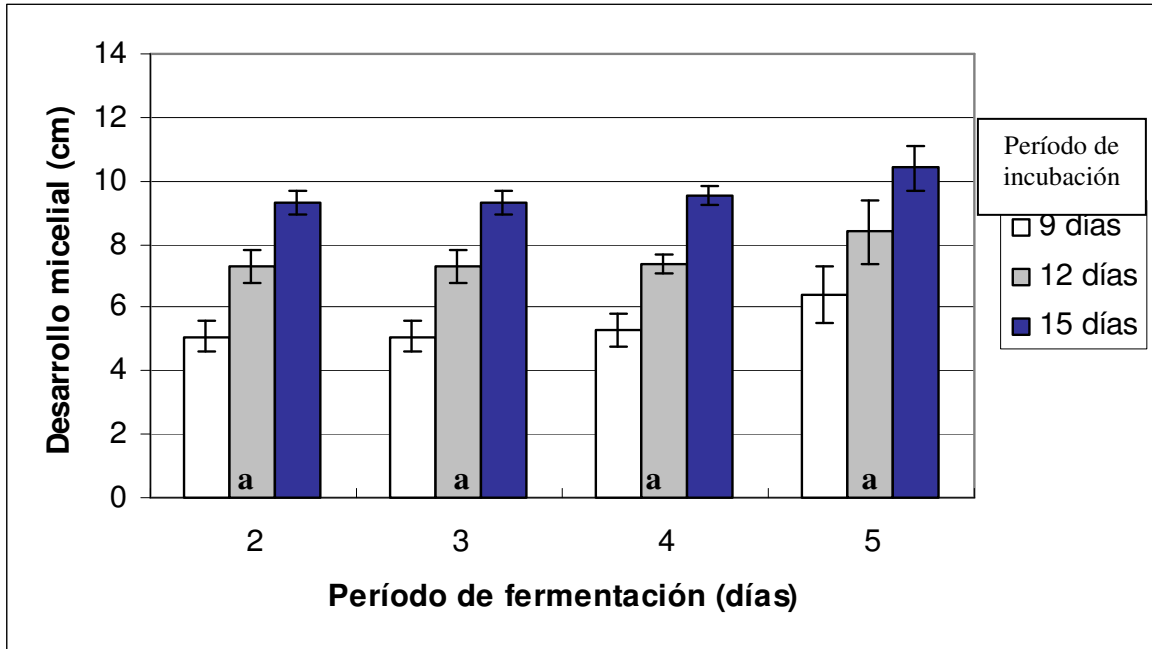
^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 17. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 2).



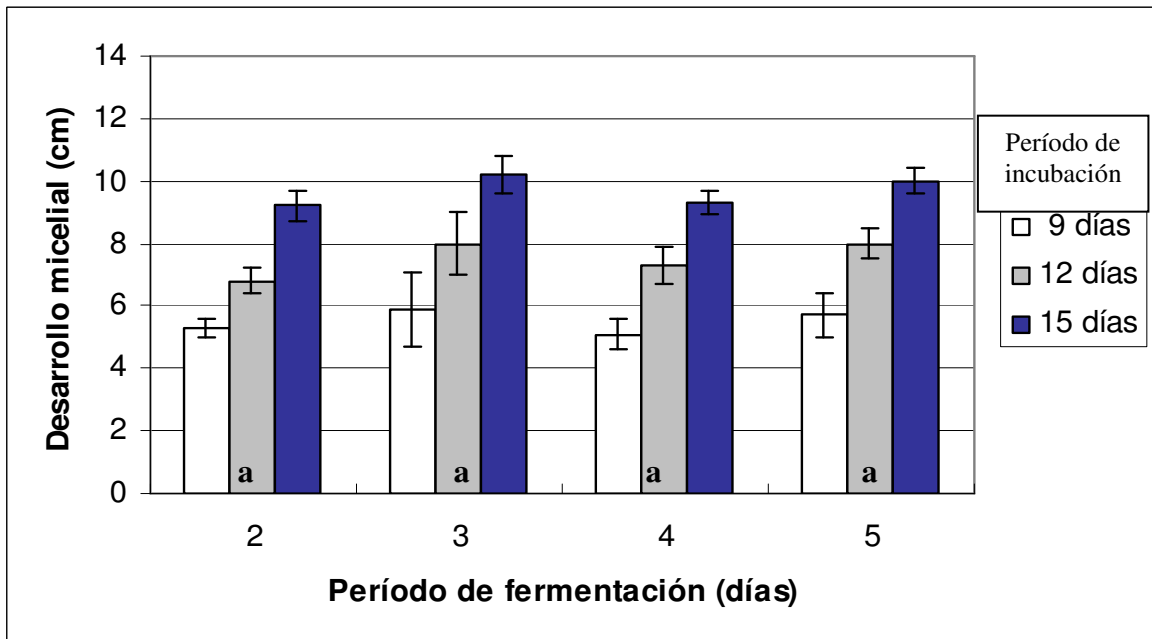
^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$).

Figura 18. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 3).



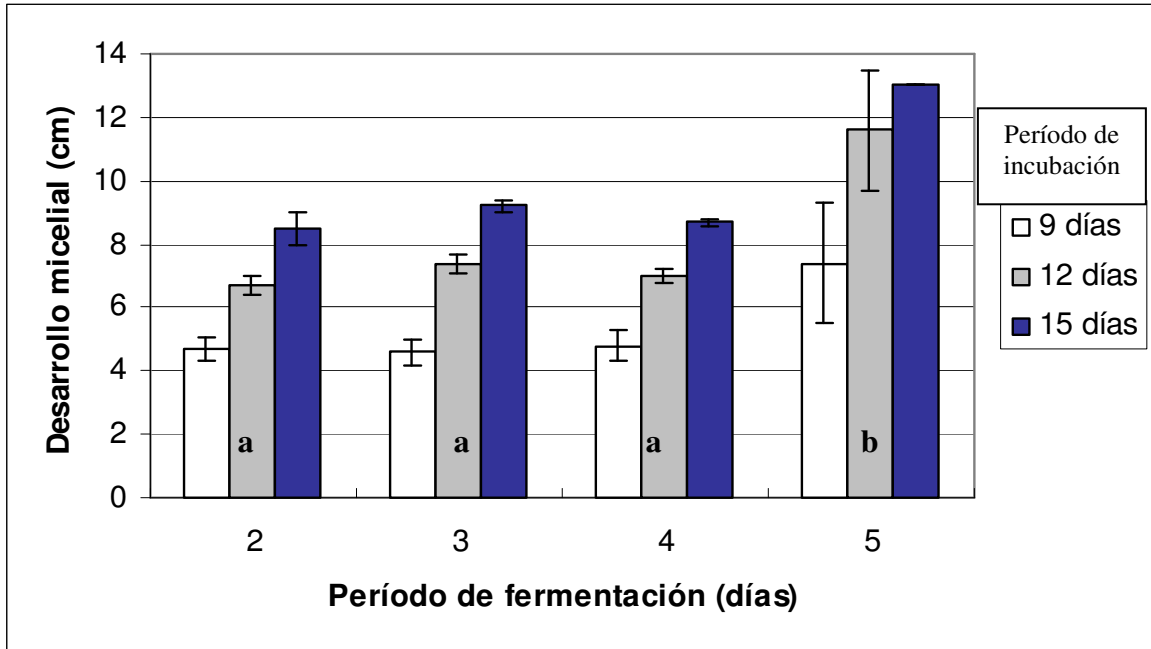
^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05).

Figura 19. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos crudos sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 3).



^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05).

Figura 20. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de baja temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 3).



^{a b c} Letras distintas en una barra indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05).

Figura 21. Desarrollo micelial (cm) de *P. ostreatus* en sustratos estériles sometidos a un proceso de pasteurización de alta temperatura, con 2, 3, 4 y 5 días de fermentación (lote 3).

Cuando se esterilizaron los sustratos de los lotes 2 y 3, pasteurizados con AT o BT se presentó la misma tendencia que en los sustratos no esterilizados, es decir no se presentaron diferencias estadísticas en el crecimiento vegetativo independientemente del tiempo de fermentación. Únicamente se alteró este patrón en el lote 3, exhibiendo un aumento significativo de la invasión micelial en los sustratos con 5 días de fermentación y pasteurización de AT (**Figuras 16, 17, 20 y 21; Tablas 31, 32, 33, 34, 40, 41 y 42 Anexo**).

Los resultados del desarrollo micelial en los 3 lotes estudiados mostraron dos comportamientos diferentes. Por una parte, como se observa en la **Tabla 7**, en los sustratos del lote 1, con el tiempo más corto de fermentación (2 días) y pasteurizados a BT, el crecimiento micelial fue significativamente mayor que con períodos más largos de fermentación (3, 4 y 5 días).

Tabla 7. Desarrollo micelial (cm), 12 días de incubación de *P. ostreatus* en sustratos crudos o estériles, pasteurizados a (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h) (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	Condiciones de pasteurización					
	AT (80°C, 6 h)			BT (60°C, 10 h) +48 h.		
	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3
Sustratos Crudos						
2	10.3 ± 0.8	8.2 ± 0.7	7.3 ± 0.5	12.8 ± 0.3	8.9 ± 0.4	7.5 ± 0.5
3	12.0 ± 1.0	8.1 ± 0.4	7.3 ± 0.5	6.5 ± 0.7	8.9 ± 0.1	7.4 ± 0.6
4	12.6 ± 0.5	7.2 ± 1.0	7.4 ± 0.3	7.1 ± 0.5	8.6 ± 0.6	7.4 ± 0.2
5	7.4 ± 0.5	8.1 ± 0.7	8.4 ± 1.0	9.8 ± 1.4	6.1 ± 0.0	7.7 ± 1.0
Sustratos Esterilizados						
2	6.9 ± 0.3	6.8 ± 0.9	6.7 ± 0.3	11.2 ± 0.7	8.3 ± 0.4	6.8 ± 0.4
3	8.0 ± 0.5	7.6 ± 0.6	7.4 ± 0.3	9.0 ± 0.5	7.2 ± 0.5	8.0 ± 1.0
4	12.8 ± 0.4	8.2 ± 0.7	7.0 ± 0.2	8.7 ± 0.5	8.1 ± 0.4	7.3 ± 0.6
5	5.4 ± 2.7	8.2 ± 0.4	11.6 ± 1.9	8.2 ± 0.8	7.9 ± 0.4	8.0 ± 0.5

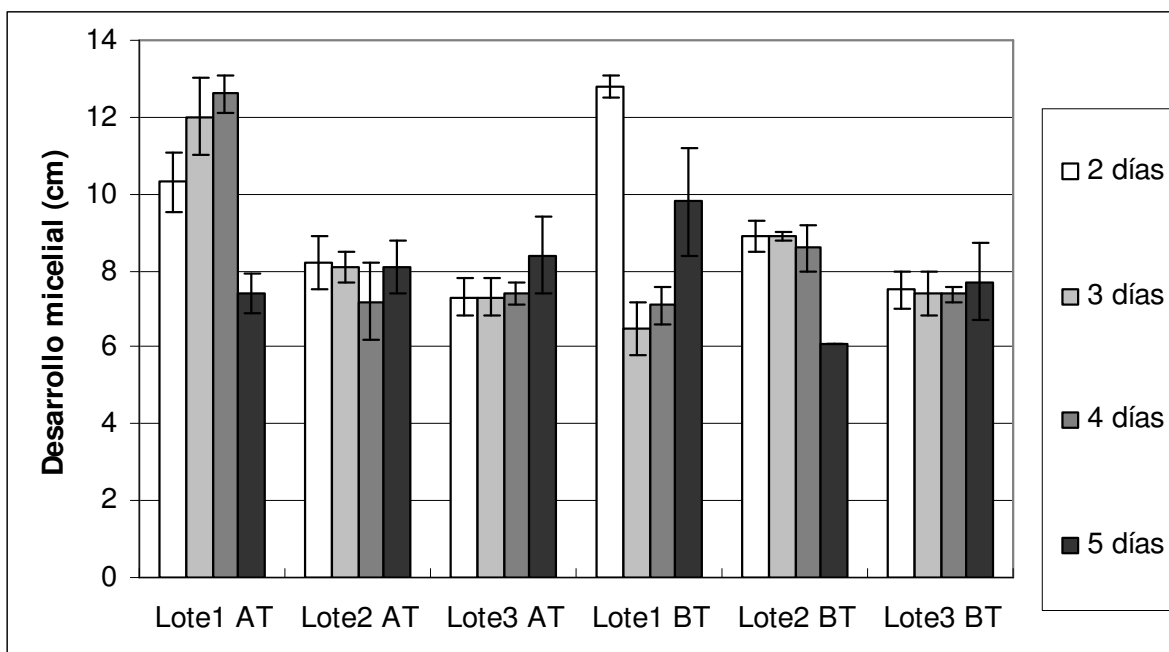


Figura 22. Desarrollo micelial (cm), 12 días de incubación de *P. ostreatus* en sustratos “crudos” sometidos a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h) y fermentados 2, 3, 4, 5 días (lotes 1, 2, 3).

Complementando esta tendencia, se observó que tanto en los sustratos pasteurizados a AT del lote 1 así como en los pasteurizados a BT del lote 2, el crecimiento vegetativo fue significativamente menor con el tiempo más largo de fermentación (5 días) que con tiempos cortos (2, 3 ó 4 días) (**Tabla 7 Figura 22**). Estos resultados sugieren que la invasión micelial con períodos cortos de fermentación (2 días) es mejor que con procesos largos (5 días).

Es posible plantear que durante la fermentación bajo estas condiciones se desarrollaron diversos microorganismos que consumieron los nutrimentos del sustrato. Conforme avanza el proceso de fermentación se consumen primero los nutrientes de fácil asimilación y después se metabolizan los más complejos como la hemicelulosa, celulosa y lignina. Por ello, en los sustratos sometidos a períodos más prolongados de fermentación habrá menor cantidad de nutrientes de fácil asimilación que eventualmente son aquellos que favorecen un desarrollo micelial rápido de *Pleurotus*. Este fenómeno ha sido comprobado en la producción de sustratos para el cultivo de champiñón donde se emplean períodos de casi 15 días de fermentación aerobia y 6 días de pasteurización-acondicionamiento. Con estos períodos tan largos de tratamiento del sustrato se reportan decrementos considerables en la calidad y cantidad de nutrientes disponibles conforme avanzan las diferentes etapas de preparación del sustrato (Gray *et al.*, 1971; Fermor *et al.*, 1979; Straatsma *et al.*, 2000).

En apoyo a esta idea se encuentran también las observaciones de Philippoussis *et al.*, (2001) quienes reportan un menor desarrollo micelial y colonización de *Pleurotus* sobre la paja de trigo, sometida a un pretratamiento de inmersión en agua por 24 h, cuando se utilizaron períodos largos de fermentación (12 días), comparado con los sustratos no “composteados”. Un fenómeno parecido fue obtenido por Mata (1992) pero con otro hongo comestible *Lentinula edodes* y utilizando sustratos de aserrín mezclado con paja; este autor observó un marcado decremento en el desarrollo micelial al incrementarse el período de fermentación de 6 a 12 y 18 días, respectivamente.

En aparente contradicción al comportamiento anterior, tanto en los sustratos del lote 2 pasteurizados con AT como en los sustratos del lote 3 con pasteurización de BT o AT, no se detectaron diferencias significativas en la invasión micelial con períodos de fermentación de 2 a 5 días (**Figura 22**). Esto no necesariamente se encuentra en oposición a la tendencia observada anteriormente, es posible que en estos tratamientos a los 2 días de fermentación ya se hubieran consumido la mayoría de los nutrientes de fácil asimilación, por lo que no fue posible detectar un efecto de mayor crecimiento micelial después de este tiempo de fermentación. Sin embargo, bajo estas condiciones a los 5 días de fermentación todavía existían suficientes nutrientes disponibles que permitió un buen desarrollo micelial, no encontrándose descenso en el mismo.

Un agente adicional que podría influir en estos resultados, fue la participación de los microorganismos durante la fermentación para que los niveles de nutrientes disponibles no variaran sensiblemente durante el curso de esta etapa. En este caso en particular, posiblemente al principio de la fermentación se presentaron microorganismos que consumieron los nutrientes de fácil asimilación, conforme avanzó el proceso la diversidad de microorganismos fue cambiando y se establecieron entonces aquellos capaces de metabolizar los polisacáridos del sustrato transformándolos en azúcares simples, manteniendo en los sustratos del lote 2 y 3 un nivel invariable, de tal forma que el desarrollo vegetativo de *P. ostreatus* se mantuvo constante.

Otro factor que podría haber afectado el desarrollo micelial fue la diferente procedencia de la paja. Esta fue de un mismo origen para los lotes 2 y 3 y de diferente origen para el lote 1, estos materiales probablemente pudieron variar en la diversidad de microorganismos, lugar de siembra (suelo), fecha de cosecha, tiempo de almacenamiento y comercialización, así mismo, no se excluye el posible uso de pesticidas, entre otras causas. Estos factores influyeron en la reproducibilidad de los experimentos e incidieron directamente en los resultados que involucraron al lote 1, comparado con los de los lotes 2 y 3. En este sentido Houdeau *et al.*, (1991) observaron una heterogeneidad en el contenido de minerales con diferencias significativas, en pajas provenientes de diferentes zonas, así como diferencias

en los rendimientos de los sustratos que fueron almacenados y posteriormente (8 meses) utilizados para el cultivo de hongos, obteniendo en estos últimos una menor producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* comparado con los rendimientos obtenidos en “pajas frescas”.

Con la esterilización de los sustratos se pretendía detectar la eventual presencia de algún factor termosensible que repercutiera en el crecimiento vegetativo. Los resultados obtenidos se pueden agrupar dentro de 3 diferentes comportamientos. En la mayoría de los casos no se observó que el crecimiento vegetativo fuese afectado con la esterilización, mientras que en otros se observó un aumento o una disminución. Una disminución significativa en el desarrollo micelial se presentó al esterilizar los sustratos del lote 1, y pasteurizados a AT con 2, 3 y 5 días de fermentación, respecto de los sustratos crudos (Figuras 22 y 23; Tablas 7, 30, 38 y 39 Anexo).

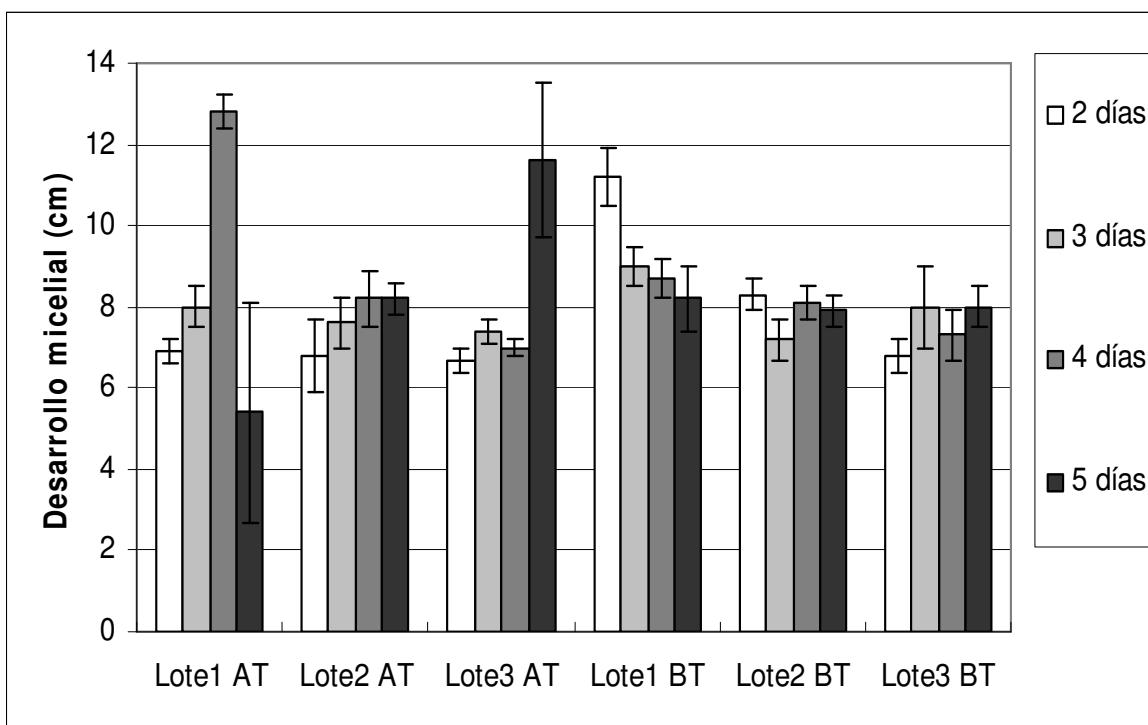


Figura 23. Desarrollo micelial (cm), 12 días de incubación de *P. ostreatus* en sustratos “estériles” sometidos a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h) y fermentados 2, 3, 4, 5 días (lotes 1, 2, 3).

Una posible explicación a este fenómeno sería que, la existencia y beneficios de un “factor termosensible” fueron “desactivados y/o perturbados” por la esterilización. La naturaleza de este factor termosensible estaría por determinarse con precisión, pero resultados preliminares indican que probablemente la presencia de microorganismos (bacterias termófilas y actinomicetes) inhibe el desarrollo de contaminantes o bien favorece el crecimiento micelial de *Pleurotus*. Esto no excluye la posible generación de metabolitos secundarios (vitaminas, antibióticos, hormonas, polisacáridos bacterianos, etc.) que eventualmente influyan positivamente sobre el crecimiento vegetativo de *Pleurotus* y/o negativamente sobre el desarrollo de microorganismos contaminantes, como ha sido reportado por Gray *et al.*, (1971), Fermor *et al.*, (1979), Schies y Lelley (1989), Stölzer y Grabbe (1991), Pardo-Núñez y García-Mendoza (2002), Velázquez -Cedeño *et al.*, (2006 a, b).

La disminución en el crecimiento vegetativo al esterilizar el sustrato podría también explicarse de una manera totalmente diferente, ya que a las temperaturas de esterilización ocurren distintos tipos de reacciones que podrían afectar la naturaleza fisicoquímica y biológica del sustrato. Los azúcares pueden sufrir caramelización o reaccionar con proteínas disminuyendo la disponibilidad de los azúcares simples, o formarse ciertas sustancias (ácidos volátiles, alcoholes, cetonas, etc.) que pudieran inhibir el desarrollo vegetativo de *Pleurotus*. Así mismo, no se excluye la posibilidad de que bajo esta temperatura los “microorganismos benéficos” principalmente bacterias termófilas y actinomicetos sean erradicados totalmente del sustrato, evitando así su colaboración protectora.

El efecto en sentido contrario, es decir un aumento significativo en la invasión micelial al esterilizar los sustratos se encontró tanto en los sustratos pasteurizados a BT con 3 y 4 días de fermentación del lote 1 (**Figura 23; Tablas 7, 8; 29, 38 y 39 Anexo**) como en los sustratos pasteurizados a AT con 5 días de fermentación del lote 3, respecto de los sustratos crudos (**Figura 22, 23; Tablas 7, 8; 34, 38, y 39 Anexo**).

Tabla 8. Efecto de la esterilización sobre el desarrollo micelial y la contaminación* de sustratos con diferentes períodos de fermentación sometidos a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h) (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	Condiciones de pasteurización					
	AT (80°C, 6 h)			BT (60°C, 10 h) +48 h		
	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3
2	--▲ 30					
3	--▲ 20		▲ 10	+	▼ 10	
4		▼ 10	▲ 20	+▼ 20		▼ 30
5	--		+▲ 10	▲ 20	▼ 20	▲ 10

Efecto sobre el Desarrollo micelial: Negativo = --, Positivo = +

Efecto sobre la Contaminación: Aumento = ▲, Disminución = ▼

*Resultados de Contaminación (ver Tabla 9).

Este comportamiento podría resultar de varias causas. Por un lado, la esterilización puede provocar una apertura en la estructura de la paja, con ruptura parcial de los enlaces de la lignina y cutina así como de algunos otros polisacáridos con la consecuente liberación de azúcares simples, que eventualmente sirven como fuente inicial de nutrientes para el desarrollo micelial de *Pleurotus*.

En este sentido, al someter los sustratos a la esterilización se podrían eliminar algunos microorganismos nocivos, competidores y/o antagonistas del micelio de *Pleurotus*. Esta idea es apoyada por los resultados del lote 1 (BT con 3 y 4 días de fermentación) donde se observó con la esterilización una disminución en la contaminación; que estuvo ausente en los sustratos fermentados por 3 días y disminuyó en los sustratos fermentados por 4 días (**Tablas 8 y 9**). No obstante, con el lote 3 (AT, 5 días de fermentación) se observó lo contrario, un aumento en la contaminación, de 0 a 10%, lo cual resulta en una mayor disponibilidad de nutrientes por efecto de la esterilización (**Tablas 8 y 9**).

7.3.2 Contaminación en el desarrollo micelial.

En la **Tabla 9**, se presentan los porcentajes de contaminación registrados en los sustratos de los 3 lotes, sometidos a distintos tiempos de fermentación y bajo las 2 condiciones de pasteurización AT y BT, durante las evaluaciones del desarrollo micelial. En el lote 1, los sustratos sometidos a pasteurización de BT presentaron un 20% de contaminación al 4° día de fermentación, mientras que en los sustratos pasteurizados con AT no presentaron contaminación. En los sustratos esterilizados se presentó la mayor incidencia de contaminación, con mayor porcentaje en los materiales pasteurizados a AT, en el lote 1 se detectó un 30 y 20% de contaminación, a los 2 y 3 días de fermentación respectivamente, y en los sustratos pasteurizados con BT un 20% a los 5 días de fermentación (**Tabla 9**).

Tabla 9. Contaminación (%) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación sometidos a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h) (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	Condiciones de pasteurización							
	AT (80°C, 6 h)				BT (60°C, 10 h) +48 h.			
	lote1	lote2	lote3	Promedio	lote1	lote2	lote3	Promedio
Sustratos crudos								
2	-	-	-	0	-	-	-	0
3	-	-	-	0	-	10	-	3
4	-	10	-	3	20	-	30	17
5	-	-	-	0	-	20	-	7
Sustratos esterilizados								
2	30	-	-	10	-	-	-	0
3	20	-	10	10	-	-	-	0
4	-	-	20	7	-	-	-	0
5	-	-	10	3	20	-	10	10

En el lote 2, se presentó el menor índice de contaminación en sus diferentes períodos y tratamientos. Los sustratos pasteurizados con BT mostraron una contaminación del 10 y 20%, al día 3 y 5 de fermentación, respectivamente. Los sustratos pasteurizados con AT presentaron un 10% de contaminación al día 4 de fermentación. En este sentido, los

sustratos pasteurizados a BT o AT, no presentaron contaminación cuando se esterilizaron (**Tabla 9**).

En el lote 3, los sustratos pasteurizados con BT mostraron una contaminación del 30% al 4° día de fermentación y los sustratos pasterizados a AT no se contaminaron. Los sustratos sometido a una pasteurización de BT y esterilizados se encontraron un 10% de contaminación al 5° día. Los sustratos pasteurizados con AT y estériles, presentaron la mayor frecuencia de contaminación en todos los lotes y condiciones estudiadas, con un 10% al 3^{er} y 5° día, y un 20% al 4° día de fermentación (**Tabla 9**).

Los resultados anteriores sugieren la existencia de una interacción entre el período de fermentación, el tratamiento térmico y la incidencia de contaminación. En la **Figura 24** se presenta la contaminación promedio para los 3 lotes, a los diferentes días de fermentación y temperaturas de pasteurización. En los sustratos con una pasteurización de BT se observó, un promedio de contaminación del 3, 17 y 7% a los 3, 4 y 5 días de fermentación respectivamente, mientras que en los sustratos con una pasteurización de AT sólo se presentó un 3% de contaminación al 4° día de fermentación.

Al esterilizar los sustratos con pasteurización de BT, la contaminación fue prácticamente eliminada (únicamente un 10% el día 5) mientras que en el caso de los sustratos pasteurizados a AT se presentó una mayor contaminación, 10% al 2° y 3^{er} día de fermentación, que disminuyó posteriormente a 7% y 3% a los 4 y 5 días, respectivamente.

En términos generales, en los sustratos pasteurizados a AT se observó menor contaminación (de 0 a 3%) que en los sustratos pasteurizados a BT, de 0 a 17 %. Este fenómeno resulta probablemente, ya que con una pasteurización de AT se logra eliminar en mayor medida a los microorganismos que invaden el sustrato durante la fermentación. Con la pasteurización a BT sobreviven probablemente un mayor número de organismos

mesófilos y termófilos, que posteriormente compiten con el micelio de *Pleurotus* por los nutrientes de fácil asimilación del sustrato.

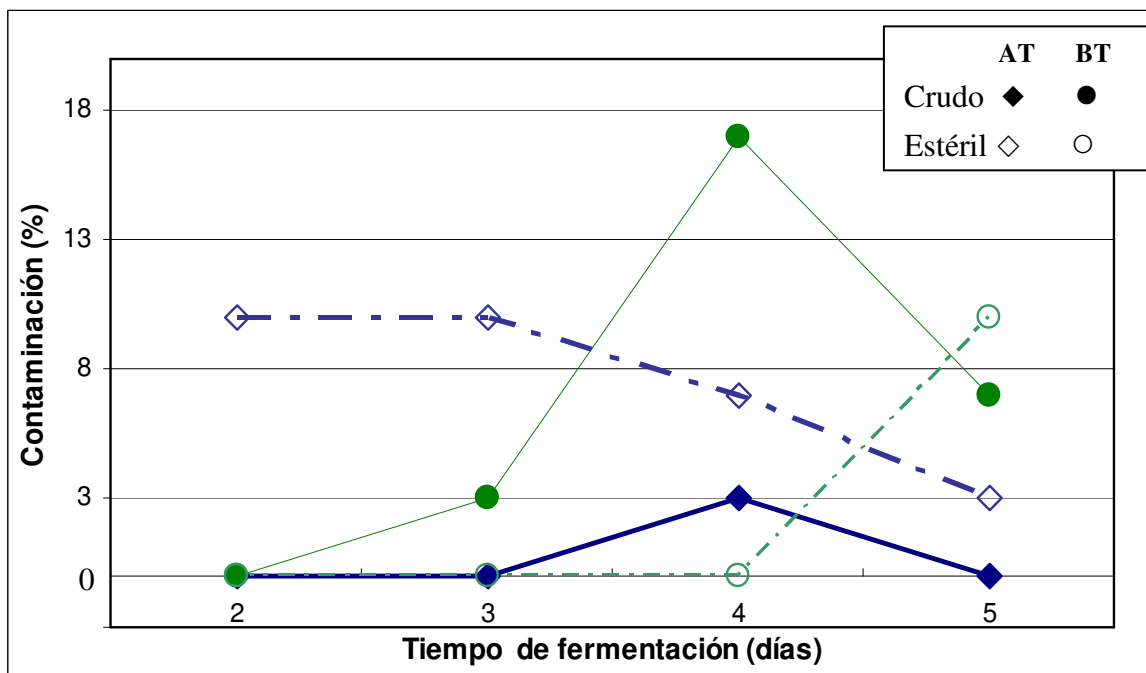


Figura 24. Promedio de contaminación (lotes 1, 2, 3), en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación y sometidos a 2 condiciones de pasteurización: AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/48 h.

Se observó asimismo que la contaminación aumentó conforme se prolonga el período de fermentación; esta fue mayor en los sustratos pasteurizados a BT con 4 y 5 días de fermentación así como a AT y con 4 días de fermentación. Probablemente, al avanzar la fermentación por una parte podría disminuir la efectividad de un factor termosensible y por otra parte se incrementa tanto el número de microorganismos como la cantidad de nutrientes disponibles como resultado del metabolismo microbiano, estos azúcares simples servirán tanto para el crecimiento micelial de *Pleurotus* como para el desarrollo de organismos contaminantes.

Estos resultados coinciden con los reportes de Schies y Lelley (1989) donde se indica que *P. ostreatus* mostró un buen desarrollo micelial en paja fermentada por 7 ó 14 días, mientras que el hongo contaminante *Trichoderma hamatum* predominaba en la paja si la fermentación se extendía a 21 días. Los autores suponen como una explicación a este fenómeno, que en la paja se presentan diversos mecanismos de defensa durante los primeros 14 días de fermentación, tales como la presencia de capas de cutina y algunos productos metabólicos microbianos, estos representarían una barrera al ataque de mohos contaminantes que posteriormente pierden su efectividad al avanzar la fermentación.

En este orden de ideas, Villa Cruz *et al.* (1999) al utilizar como sustrato una combinación (1:1) de pulpa de café con rastrojo de maíz, esta mezcla fue tratada con una solución de agua con 2% Ca (OH)₂ ó 100 ppm de Benomyl, y posteriormente fermentada por 5, 7 y 9 días, los montones se volteaban cada 24 h. Estos autores concluyeron que cuando se logra llegar a una temperatura de fermentación de entre 59 a 66°C sólo se requieren de 2 a 3 días más para lograr sustratos mas selectivos que con períodos mayores (7 ó 9 días). Por otro lado, Stölzer y Grabbe (1991) llegaron a conclusiones algo diferentes a las aquí encontradas, ya que reportaron que los sustratos pasteurizados por 24 h a 75-85°C permitían el crecimiento tanto de *Pleurotus*, como de hongos competidores, mientras que un tratamiento de fermentación por 24 h a 65°C permitía un desarrollo selectivo de *Pleurotus*.

Al evaluar el efecto de la esterilización sobre la contaminación se invirtió el patrón de contaminación observado en los sustratos crudos. Inesperadamente, la contaminación se incrementó en los sustratos pasteurizados a AT y disminuyó en los pasteurizados a BT (**Tabla 9**). Se presentó contaminación en los sustratos de AT desde 2 hasta 5 días de fermentación, lo cual como se muestra en la **Tabla 8**, se encuentra asociado a una disminución en el desarrollo vegetativo en lote 1 con 2, 3 y 5 días de fermentación.

El incremento en la contaminación de los sustratos esterilizados y pasteurizados a AT podría por un lado ser resultado de la eliminación tanto de microorganismos benéficos, así

como de otros factores de naturaleza termosensible que se establecen en el sustrato durante la etapa de fermentación, afectando negativamente la selectividad en términos de disminución en el desarrollo micelial, menores rendimientos de *Pleurotus* y una mayor susceptibilidad a la contaminación. Algunos autores como Gray *et al.*, (1971), Fermor *et al.*, (1979), Schies y Lelley (1989), Stölzer y Grabbe (1991), Pardo-Núñez y García-Mendoza (2002), Velázquez -Cedeño *et al.*, (2006) a, b, proponen que algunos microorganismos que invaden el sustrato durante la fermentación impiden el crecimiento de agentes biológicos contaminantes o bien producen metabolitos secundarios que inhiben la presencia y desarrollo de organismos antagónicos y contaminantes. En este orden de ideas, se ha observado que la pasteurización a 70-80°C elimina un buen número de microorganismos y entre ellos aquellos que eventualmente podrían contribuir a la selectividad del sustrato como las bacterias termófilas y los actinomicetes.

Como un efecto adicional de la esterilización del sustrato, podría haberse producido también una apertura de la estructura de la paja con una consecuente liberación de azúcares simples, que eventualmente ocasionarían un incremento en la contaminación de los sustratos pasteurizados a AT, en donde debe hacerse notar que también se registró un aumento en el crecimiento vegetativo de *Pleurotus* (lote 3, con 5 días de fermentación). Stölzer y Grabbe (1991) observaron que *Trichoderma hamatum*, organismo incapaz de degradar las capas de lignina que cubren las fibras de celulosa y por lo tanto establecerse con éxito en el sustrato, invadía más fácilmente las pajas pasteurizadas a alta temperatura (85°C) o esterilizadas, ya que mediante estos tratamientos térmicos los enlaces químicos de la lignina y celulosa son parcialmente eliminados.

7.3.3 Azúcares reductores.

Adicionalmente a los parámetros anteriores, se determinó la evolución de los azúcares reductores en los sustratos sometidos a las diferentes temperaturas de pasteurización. Se observaron los cambios en el contenido de azúcares reductores a través de los diferentes días de fermentación y durante la pasteurización-acondicionamiento, para determinar sí

existe alguna interacción entre estos cambios de concentración y la selectividad del sustrato, directamente sobre el desarrollo micelial, la incidencia de contaminación y la producción de cuerpos fructíferos. En las siguientes tablas se presentan los resultados correspondientes a los valores de azúcares reductores de los 3 lotes.

En el lote 1, en los sustratos pasteurizados a alta temperatura se presentó una disminución en la concentración de azúcares al prolongarse el período de fermentación, pasando de 1515 con 2 días a 713 mg/kg a los 5 días de fermentación (**Tabla 10**). Con 2 días de fermentación se obtuvieron las concentraciones de azúcares estadísticamente mayores ($\alpha=0.05$, $P<3.17$) que con el resto del período de fermentación (**Tablas 43 y 44 Anexo**). Sin embargo, esta disminución en la concentración de azúcares reductores no está asociada al desarrollo micelial, ya que como indica la **Figura 11** los sustratos fermentados por 2, 3 y 4 días presentaron un desarrollo micelial similar, el cual sí fue significativamente menor ($\alpha=0.05$, $P<3.17$) al extenderse la fermentación a 5 días (**Tablas 30, 38 y 39 Anexo**). También es de hacer notar que no se observó una relación entre la disminución en el contenido de azúcares reductores y la incidencia de contaminación del sustrato, ya que esta no se presentó en ningún caso, bajo las condiciones antes mencionadas (**Tabla 9**).

En los sustratos con un tratamiento térmico de baja temperatura, al final de la pasteurización (0 h de acondicionamiento) se observó una disminución en la concentración de azúcares al incrementarse el tiempo de fermentación, pasando de 1619 a 792 mg/kg, con 2 a 5 días de fermentación, respectivamente. A las 24 h de acondicionamiento, los sustratos presentaron valores alrededor de 1500 mg/kg con 2 y 3 días de fermentación, para disminuir a 894 mg/kg al 4° día y aumentar a 1242 mg/kg con 5 días de fermentación. A las 48 h de acondicionamiento se observó una tendencia similar, pero con valores menores excepto el día 5. Así, a los 2 y 3 días de fermentación la concentración de azúcares reductores fue de 1100 mg/kg y al 4° día disminuyó a 650 mg/kg, para aumentar nuevamente a 1256 mg/kg al día 5 (**Tabla 10**).

Considerando ahora estos resultados conforme avanzó el tiempo de acondicionamiento, en su primera etapa, de 0 a 24 h, la concentración de azúcares se mantuvo sin cambios sustanciales en los sustratos fermentados 2, 3 y 4 días, mientras que en el sustrato fermentado por 5 días se observó un aumento considerable en estas primeras 24 h. Al avanzar el acondicionamiento a 48 h, la concentración de azúcares se redujo, en los sustratos con 2, 3 y 4 días, pero en este caso, en el sustrato con 5 días de fermentación la concentración de azúcares se conservó sin cambio (**Tabla 10**). A este tiempo de acondicionamiento, los sustratos con 2, 3 y 5 días de fermentación presentaron una concentración de azúcares estadísticamente mayor ($\alpha=0.05$, $P<3.17$) que el sustrato con 4 días de fermentación (**Tablas 43 y 44 Anexo**).

Tabla 10. Azúcares reductores en el sustrato* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, sometido a dos condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/24 ó 48 h) (lote 1).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condiciones de pasteurización			
	AT (80°C, 6 h)	BT (60°C, 10 h)		
		Tiempo de acondicionamiento a 50°C (h)		
		0	24	48
2	1515 ^c ± 172	1619 ± 142	1421 ± 91	1097 ^b ± 36
3	992 ^b ± 57	1297 ± 148	1531 ± 90	1171 ^b ± 57
4	817 ^{ab} ± 63	867 ± 34	894 ± 38	650 ^a ± 27
5	713 ^a ± 53	792 ± 29	1242 ± 79	1256 ^b ± 50

^{a b c} Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$, $P<3.17$).

* Paja seca 1872 ± 144 mg /kg.

A pesar de esto, la invasión micelial fue semejante en los sustratos con 3, 4 ó 5 días de fermentación pero inferior a la del sustrato con 2 días de fermentación. Por otro lado, el sustrato con 4 días de fermentación y menor contenido de azúcares fue el único en cual se observó contaminación (20%) (**Figura 10, Tablas 9 y 10**). Es decir, en los sustratos del lote 1 pasteurizados a baja temperatura tampoco se observó una asociación entre la concentración de azúcares y el desarrollo micelial, pero contrariamente a lo esperado el sustrato con menor concentración de azúcares fue el único caso en donde se registró contaminación.

Aun cuando los lotes 2 y 3 presentaron valores de azúcares reductores con las mismas tendencias, así como otras semejanzas tanto en el desarrollo micelial, como en la frecuencia de contaminación previamente analizada, resulta interesante examinar los resultados de cada lote de manera individual.

En el lote 2, los sustratos pasteurizados a AT mostraron una tendencia similar al lote 1, es decir una disminución en la concentración de azúcares al avanzar el período de fermentación, pasando de 1894 a 807 mg/kg, del día 2 al 5 respectivamente (**Tabla 11**). El sustrato con 2 días de fermentación exhibió una concentración de azúcares estadísticamente mayor ($\alpha=0.05$, $P<3.17$) y el sustrato con 5 días de fermentación la concentración de azúcares significativamente menor (**Tablas 11, 45 y 46 Anexo**). Nuevamente, este fenómeno no estuvo asociado a la invasión micelial de *Pleurotus* en el sustrato, presentándose un crecimiento vegetativo similar para todos los sustratos (**Figura 15**). En este caso, únicamente hubo contaminación (10%) en los sustratos con 4 días de fermentación, que muestran un nivel intermedio de azúcares solubles (**Tabla 9**).

Los sustratos del lote 2 y pasteurizados a BT, al finalizar la pasteurización exhibieron una concentración de azúcares similar del día 2 al 4 de fermentación, de aproximadamente 1300 mg/kg, este valor disminuyó a 1068 mg/kg el 5° día de fermentación. A las 24 h de acondicionamiento, nuevamente se observaron valores similares alrededor de 900 mg/kg del día 2 al 4 de fermentación, pero en este caso aumentaban al día 5 a un valor de 1214 mg/kg. A las 48 h de acondicionamiento, en los sustratos con 2 y 3 días de fermentación, se obtuvieron valores parecidos a los determinados a las 24 h, 907 y 965 mg/kg respectivamente, incrementándose las concentraciones de azúcares reductores con valores de 1052 y 1021 mg/kg en los sustratos con 4 y 5 días de fermentación (**Tabla 11**).

Tabla 11. Azúcares reductores en el sustrato* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, sometido a dos condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/24 ó 48 h) (lote 2).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condiciones de pasteurización			
	AT (80°C, 6 h)	BT (60°C, 10 h)		
		Tiempo de acondicionamiento a 50°C (h)		
		0	24	48
2	1894 ^c ± 70	1282 ± 126	973 ± 62	907 ^a ± 80
3	1280 ^b ± 156	1345 ± 43	965 ± 40	965 ^a ± 52
4	1193 ^b ± 76	1307 ± 48	889 ± 64	1052 ^b ± 43
5	807 ^a ± 43	1068 ± 20	1214 ± 98	1021 ^b ± 17

^{a b c} Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$, $P < 3.17$).

* Paja seca 1838 ± 215 mg /kg.

Considerando los resultados conforme avanza el tiempo de acondicionamiento, de 0 a 24 h, la concentración de azúcares reductores disminuyó en los sustratos fermentados 2, 3 y 4 días, incrementándose la concentración de azúcares exclusivamente en los sustratos con 5 días de fermentación. Al final del acondicionamiento (48 h) los sustratos con 2 y 3 días de fermentación mantuvieron concentraciones de azúcares semejantes a los valores de 24 h, mientras que en los sustratos con 4 y 5 días de fermentación aumentaron y disminuyeron sus concentraciones de azúcares, respectivamente (**Tabla 11**).

En los sustratos con 48 h de acondicionamiento se encontraron dos grupos estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$, $P < 3.17$), uno representado por los sustratos fermentados por 2 y 3 días y con concentraciones de azúcares significativamente menores, y otro con valores estadísticamente mayores, los sustratos con 4 y 5 días de fermentación (**Tabla 11**, **45** y **46 Anexo**). Estas diferencias en el contenido de azúcares no se encuentran asociadas con el desarrollo vegetativo de *Pleurotus*, ya que como se muestra en la **Figura 14**, este fue similar en los sustratos con 2, 3 y 4 días de fermentación, disminuyendo considerablemente en el sustrato con 5 días de fermentación. Paradójicamente la contaminación se presentó en los sustratos con menores y mayores concentraciones de azúcares, un 10% en los sustratos fermentados por 3 días y 20% con 5 días de fermentación (**Tablas 9** y **11**).

Con el lote 3, al realizar una pasteurización de AT nuevamente se presentó la misma tendencia que en los 2 lotes anteriores, esto significa que se confirmó el consumo paulatino de azúcares reductores al incrementarse el período de fermentación, pasando en este caso de 1380 a 764 mg/kg, en los sustratos de 2 a 5 días de fermentación (**Tabla 12**). De igual forma que el lote 2, los sustratos con 2 y 5 días de fermentación presentaron la concentración de azúcares reductores estadísticamente mayor y menor, respectivamente. Estos contrastes en las concentraciones de azúcares reductores no afectó la invasión micelial, ya que como se indica en la **Figura 19** todos los sustratos fueron invadidos en forma semejante por el micelio de *Pleurotus*. Así mismo, esta variación en el contenido de azúcares reductores en el sustrato no afectó la susceptibilidad a la contaminación, ya que en ningún caso se presentó (**Tabla 9**).

En este lote 3, al terminar la pasteurización de BT (0 h de acondicionamiento), se observó que al avanzar el tiempo de fermentación la concentración de azúcares disminuía gradualmente en los sustratos, pasando de 1498 mg/kg con 2 días de fermentación, para el día 3 y 4 a valores alrededor de 1350 mg/kg, y finalmente a 1003 mg/kg el último día de fermentación. A las 24 h de acondicionamiento, se observaron valores similares de azúcares reductores en todos los sustratos independientemente del tiempo de fermentación, alrededor de 1050 mg/kg. A las 48 h, en los sustratos con 2 días de fermentación se registró un valor de 896 mg/kg, el cual se incrementó a un promedio de 1100 mg/kg en el resto de los sustratos con 3, 4 y 5 días de fermentación (**Tabla 12**).

Examinando estos resultados conforme avanzaba el tiempo de acondicionamiento, en las primeras 24 h de acondicionamiento la concentración de azúcares reductores disminuyó en los sustratos con 2, 3 y 4 días de fermentación, mientras que en los sustratos con 5 días de fermentación no se observaron cambios considerables. A las 48 h de acondicionamiento la concentración de azúcares se redujo considerablemente en el sustrato con 2 días de fermentación, la cual fue significativamente menor que en el resto de los sustratos (3, 4 y 5 días de fermentación) en donde no se observaron cambios respecto a las 24 h de acondicionamiento (**Tablas 12, 47 y 48 Anexo**). Es importante resaltar que estas diferencias en los contenidos de azúcares reductores, no mostraron relación con el

desarrollo micelial de *Pleurotus* ya que todos los sustratos presentaron crecimientos vegetativos similares, independientemente del tiempo de fermentación (**Figura 18**). Lo mismo puede decirse para el caso de la contaminación, esta únicamente se observó en los sustratos con 4 días de fermentación, con un 30% (**Tabla 9**).

Tabla 12. Azúcares reductores en el sustrato* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, sometido a dos condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6 h, BT = 60°C/10 h + acondicionamiento a 50°C/24 ó 48 h) (lote 3).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condiciones de pasteurización			
	AT (80°C, 6 h)	BT (60°C, 10 h)		
		Tiempo de acondicionamiento a 50°C		
		0 h	24 h	48 h
2	1380 ^d ± 52	1498 ± 79	1023 ± 82	896 ^a ± 70
3	1118 ^c ± 72	1356 ± 94	1029 ± 67	1088 ^{bc} ± 59
4	998 ^b ± 59	1362 ± 109	1029 ± 82	1026 ^b ± 81
5	764 ^a ± 74	1003 ± 58	1103 ± 41	1131 ^c ± 93

^{a b c} Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05, $P < 3.17$)

* Paja seca 1838 ± 215 mg /kg.

Al analizar los sustratos pasteurizados a AT de los 3 lotes en conjunto, como se advierte en la **Tabla 13** y **Figura 25**, se observa como un patrón generalizado, una tendencia a disminuir la concentración de azúcares reductores conforme transcurre el período de fermentación, pasando de un promedio de 1596 a 761 mg/kg con 2 a 5 días de fermentación, resultados significativamente diferentes ($\alpha=0.05$, $P < 3.17$) y representando los valores con mayor y menor concentración de azúcares, respectivamente (**Tablas 13, 49, 50 y 51 Anexo**). Este fenómeno se puede explicar por el consumo de los azúcares reductores, que se lleva a cabo por los diversos microorganismos que invaden el sustrato durante esta etapa de fermentación.

No obstante, como se indica en las **Figuras 11, 15 y 19**, estos resultados no demostraron que exista una correlación entre la disminución de azúcares en el sustrato y la invasión micelial. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento vegetativo de *Pleurotus* en los sustratos a través de los diferentes días de fermentación en los 3 lotes, con

excepción del lote 1 (**Figura 11**), el cual presentó una invasión micelial significativamente menor al extenderse la fermentación a 5 días (**Tablas 49, 50 y 51 Anexo**).

Tabla 13. Azúcares reductores en el sustrato* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometido a una pasteurización de AT (80°C/6 h).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condiciones de pasteurización AT (80°C, 6 h)			
	lote 1	lote 2	lote 3	Promedio
2	1515 ^c ± 172	1894 ^c ± 70	1380 ^d ± 52	1596 ^c ± 266
3	992 ^b ± 57	1280 ^b ± 156	1118 ^c ± 72	1130 ^b ± 144
4	817 ^{ab} ± 63	1193 ^b ± 76	998 ^b ± 59	1003 ^{ab} ± 188
5	713 ^a ± 53	807 ^a ± 43	764 ^a ± 74	761 ^a ± 47

^{abc} Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0.05)

* Paja seca 1872 ± 144 mg/kg. lote 1

* Paja seca 1838 ± 215 mg/kg. lotes 2 y 3

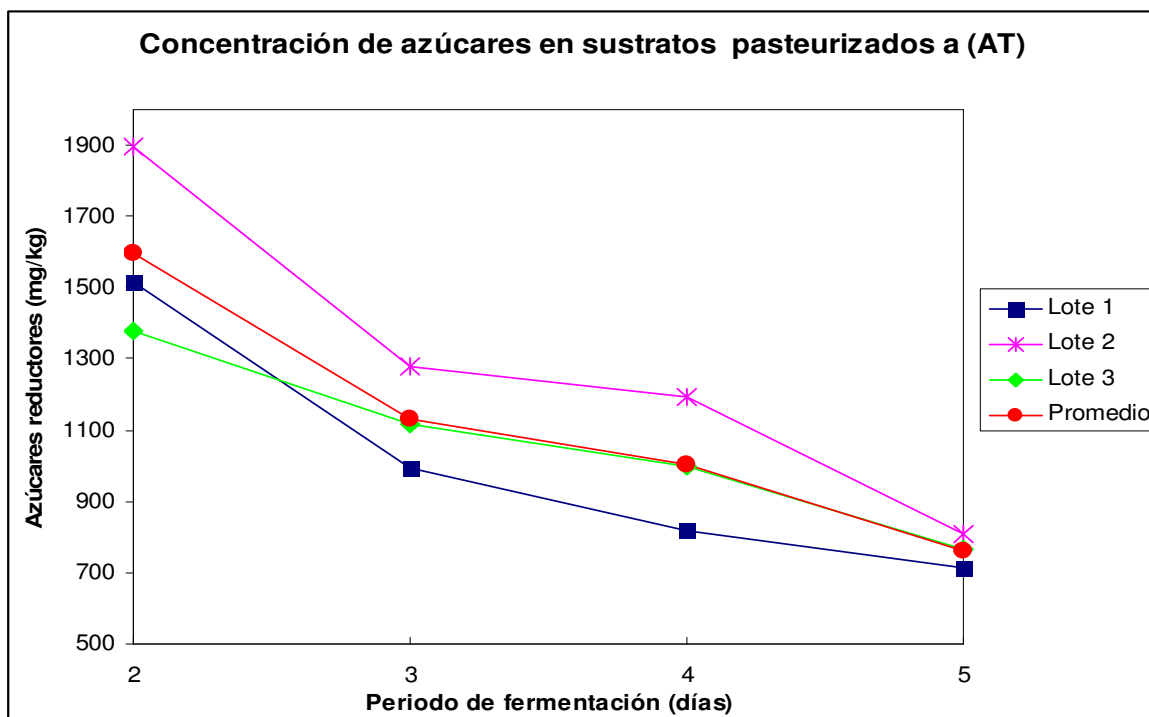


Figura 25. Azúcares reductores en los sustratos (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de AT (80°C/6 h).

En relación con la incidencia de contaminación, en los sustratos con pasteurización a AT, fue mucho menor que la observada en los sustratos pasteurizados a BT. La contaminación promedio para todos los lotes pasteurizados a AT fue de 3% pero se presentó exclusivamente en el sustrato con 4 días de fermentación del lote 2 (**Tabla 9** y **Figura 24**). De igual forma aunque con valores ligeramente mayores el conjunto de los 3 lotes pero en este caso a los sustratos pasteurizados con BT, en la **Tabla 14** y **Figura 26** se observó al final de la pasteurización (0 h acondicionamiento), una tendencia clara a reducir la concentración de azúcares con el avance de la fermentación. Se presentó una disminución significativa de un promedio general de 1466 mg/kg en los sustratos con 2 días de fermentación a 954 mg/kg al extenderse la fermentación a 5 días. Es de hacer notar que esta tendencia global se mostró también en cada uno de los 3 lotes, al considerarlos individualmente (**Figura 26; Tablas 14, 52, 53 y 54 Anexo**), en este sentido la tendencia a disminuir la concentración de azúcares reductores al término de la pasteurización es parecida a la observada en los sustratos pasteurizados a AT (**Tabla 17** y **Figura 29**).

Como se observa en las **Tablas 14 y 15; Figura 27**, la concentración de azúcares al final de la pasteurización (0 h de acondicionamiento) disminuyó en los sustratos del lote 1, al avanzar el acondicionamiento a 24 h para el caso de los sustratos con un período de fermentación de 2 días, pero aumentó sí la fermentación era de 3 ó 5 días, y se mantuvo sin cambio con 4 días de fermentación. También en los lotes 2 y 3 se observó una disminución en la concentración de azúcares respecto a los valores con 0 h de acondicionamiento en los sustratos fermentados por 2, 3 y 4 días, mientras que aumentaba cuando la fermentación se extendía a 5 días (**Tabla 14** y **Figura 26**). En el caso de estos lotes 2 y 3 los azúcares solubles en los sustratos con 24 h de acondicionamiento mostraron valores que no se modificaban entre sí en los sustratos fermentados por 2, 3 y 4 días, pero la concentración de azúcares se incrementó al prolongarse la fermentación a 5 días (**Tabla 15** y **Figura 27**).

Se observó un patrón distinto en el lote 1, donde los sustratos fermentados 2 y 3 días mostraron valores superiores a los fermentados por 5 días que a su vez fueron mayores que los correspondientes a 4 días de fermentación. Estas variaciones en los patrones de cómo

cambia la concentración de azúcares solubles conforme avanza la fermentación, no se refleja al considerar los valores promedio indicados en la **Figura 27** y **Tablas 15; 55 y 56 Anexo**.

Tabla 14. Azúcares reductores en el sustrato* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h).

Período de fermentación del sustrato (días)	Acondicionamiento 0 h			
	lote 1	lote 2	lote 3	Promedio
2	1619 ± 142	1282 ± 126	1498 ± 79	1466 ^b ± 171
3	1297 ± 148	1345 ± 43	1356 ± 94	1333 ^b ± 31
4	867 ± 34	1307 ± 48	1362 ± 109	1179 ^{ab} ± 271
5	792 ± 29	1068 ± 20	1003 ± 58	954 ^a ± 144

^{a,b} Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$)

* Paja seca 1872 ± 144 mg /kg. lote 1

* Paja seca 1838 ± 215 mg /kg. lotes 2 y 3

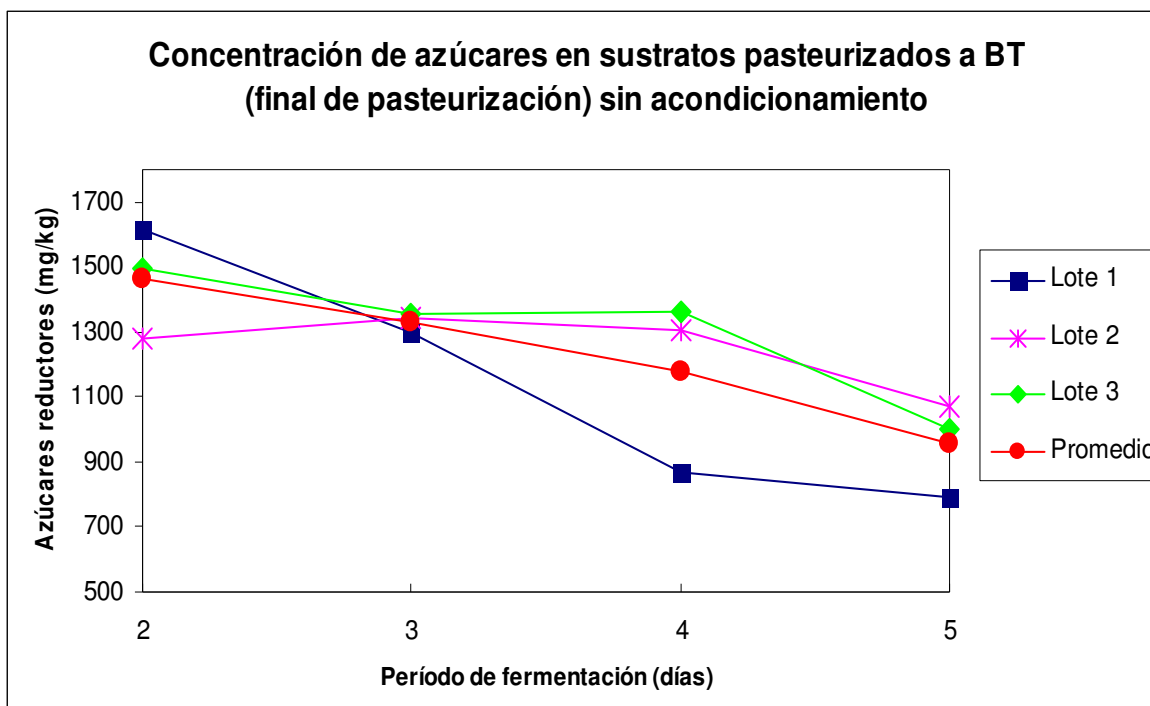


Figura 26. Azúcares reductores en los sustratos (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h).

Tabla 15. Azúcares reductores en los sustratos* (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h + 50°C/24 h).

Período de fermentación del sustrato (días)	Acondicionamiento a 50°C, 24 h			
	lote 1	lote 2	lote 3	Promedio
2	1421 ± 91	973 ± 62	1023 ± 82	1139 ^a ± 245
3	1531 ± 90	965 ± 40	1029 ± 67	1175 ^a ± 310
4	894 ± 38	889 ± 64	1029 ± 82	937 ^a ± 79
5	1242 ± 79	1214 ± 98	1103 ± 41	1186 ^a ± 74

^a Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$)

* Paja seca 1872 ± 144 mg/kg. lote 1

* Paja seca 1838 ± 215 mg/kg. lotes 2 y 3

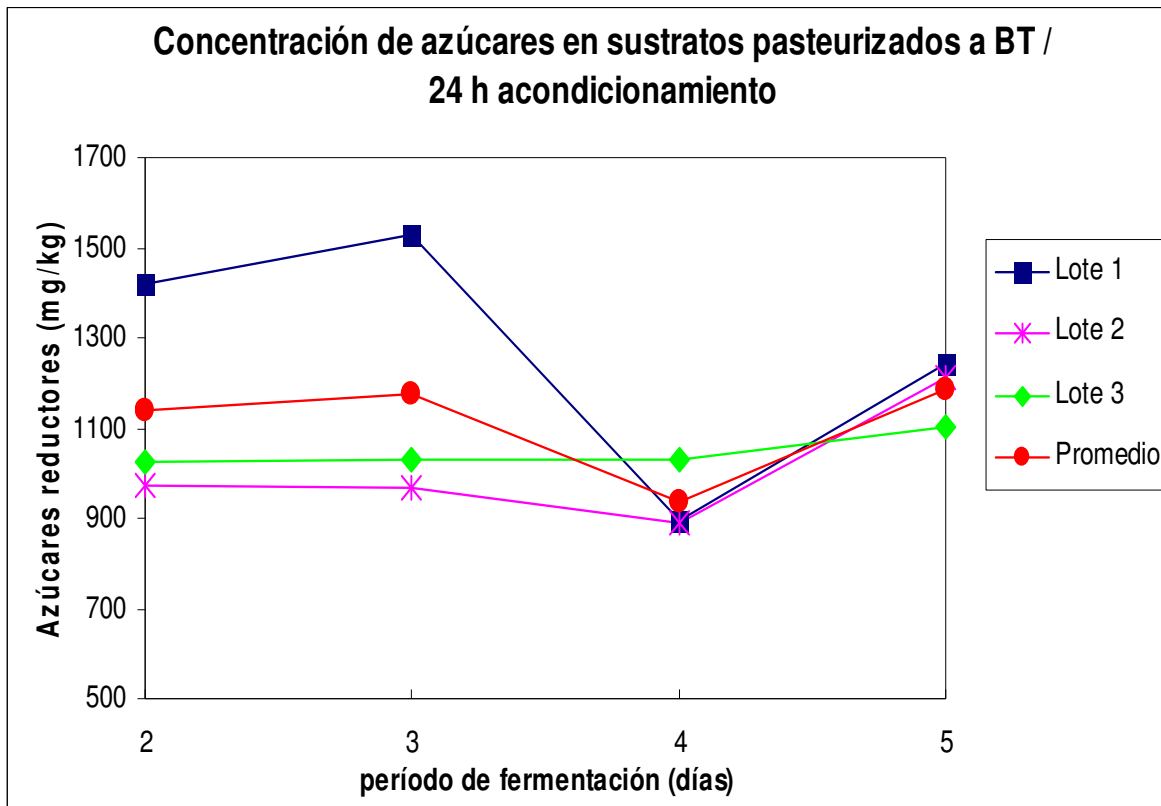


Figura 27. Azúcares reductores en los sustratos (mg/kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h + 50°C/24 h).

Puede observarse que a las 24 h de acondicionamiento la concentración promedio de azúcares solubles fue similar, independientemente del período de fermentación, exhibiendo valores de 1139 a 1186 mg/kg con 2 a 5 días de fermentación, respectivamente a diferencia de la disminución observada al inicio del acondicionamiento (**Tablas 14, 15 y Figuras 26 y 27**). Como se indica en la **Tabla 16 y Figura 28**, en el lote 1 al avanzar el acondicionamiento de 24 a 48 h, se observó en la mayoría de los casos una disminución en la concentración de azúcares reductores respecto al sustrato con 24 h de acondicionamiento (**Tabla 15 y Figura 27**), este descenso fue más evidente en el sustrato con 4 días de fermentación. En el caso de los sustratos de los lotes 2 y 3 a las 48 h de acondicionamiento las concentraciones de azúcares en términos generales no cambiaron respecto a los valores para 24 h. Por lo mismo, los promedios de los 3 lotes no presentaron diferencias significativas al prolongarse el tiempo de fermentación, con valores de 967 a 1136 mg/kg con 2 a 5 días de fermentación (**Tablas 16 y 57 Anexo**), comportamiento similar al observado a las 24 h de acondicionamiento.

En lo que se refiere a la invasión micelial para los sustratos del lote 1, como se observa en la **Figura 10**, esta fue significativamente mayor en los sustratos con 2 días de fermentación, que en los sustratos de 3, 4 y 5 días de fermentación. Por otra parte en los sustratos de los lotes 2 y 3 como se muestra en las **Figuras 14 y 18** la invasión micelial fue similar en la mayoría de las condiciones evaluadas sin diferencias significativas, a excepción del lote 2 en los sustratos fermentados por 5 días donde el avance vegetativo fue significativamente menor. En este sentido, en los sustratos con estas condiciones de pasteurización se detectó una mayor frecuencia de contaminación para la mayoría de los días de fermentación 3, 4 y 5 días, con excepción de los sustratos con 2 días de fermentación, los cuales no presentaron contaminación en ninguno de los tres lotes investigados (**Tabla 9 y Figura 24**).

Finalmente, como se muestra en la **Tabla 17 y Figura 29**, al promediar los valores obtenidos en los sustratos de los 3 lotes experimentales, se presentó una tendencia clara a reducir gradualmente el contenido de azúcares reductores a través de los diferentes días de fermentación, al termino de los tratamientos de pasteurización de AT o BT. Por otra parte,

en los sustratos pasteurizados a BT cuando se prolongaba el tiempo de acondicionamiento de 24 a 48 h, no se observaron cambios importantes en la concentración de azúcares reductores, independientemente del período de fermentación.

Tabla 16. Azúcares reductores en los sustratos* (mg /kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h + 50°C/48 h).

Período de fermentación del sustrato (días)	Acondicionamiento a 50°C, 48 h			
	lote 1	lote 2	lote 3	Promedio
2	1097 ^b ± 36	907 ^a ± 80	896 ^a ± 70	967 ^a ± 113
3	1171 ^b ± 57	965 ^a ± 52	1088 ^{bc} ± 59	1075 ^a ± 104
4	650 ^a ± 27	1052 ^b ± 43	1026 ^b ± 81	909 ^a ± 225
5	1256 ^b ± 50	1021 ^b ± 17	1131 ^c ± 93	1136 ^a ± 118

^a Letras iguales en una misma columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas (Duncan, α 0,05)

* Paja seca 1872 ± 144 mg /kg. lote 1

* Paja seca 1838 ± 215 mg /kg. lotes 2 y 3

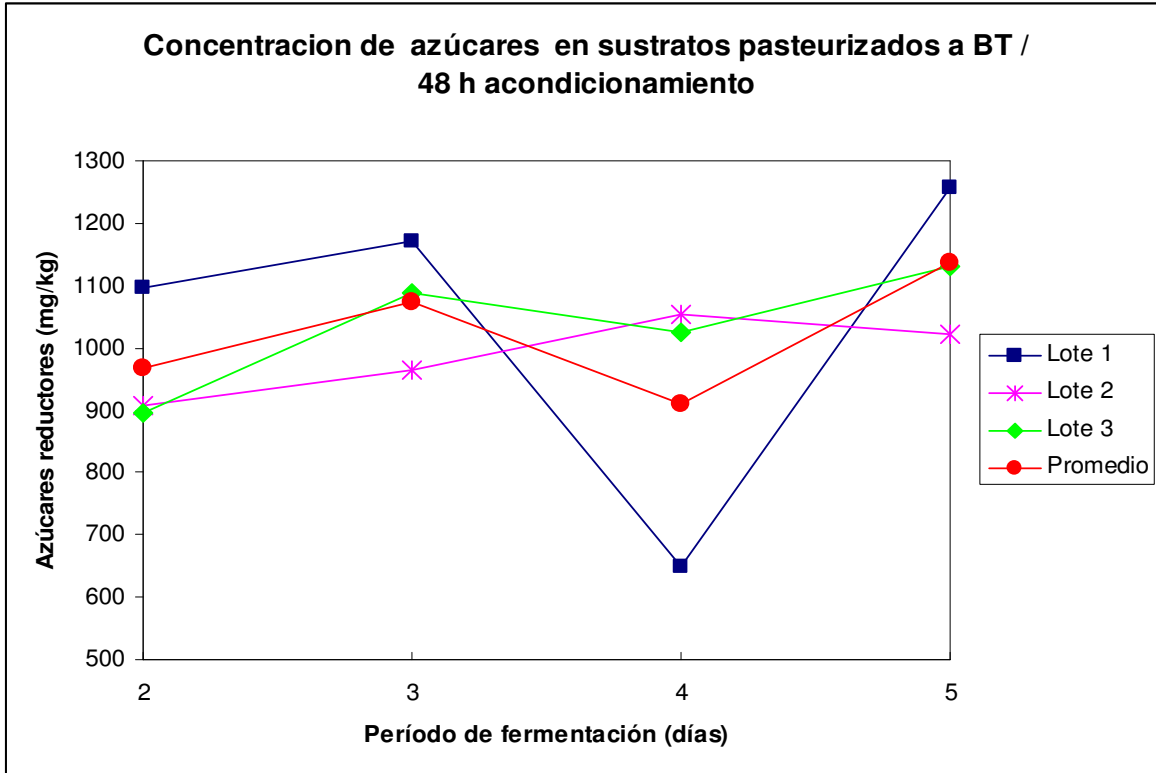


Figura 28. Azúcares reductores en los sustratos (mg /kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, de los lotes 1, 2 y 3 y promedio, sometidos a una pasteurización de BT (60°C/10 h + 50°C/48 h).

Tabla 17. Azúcares reductores en los sustratos* (mg /kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, promedios de los lotes 1, 2 y 3, sometidos a una pasteurización de AT (80°C/6 h) o BT (60°C/10 h + 50°C/0, 24 y 48 h).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condiciones de pasteurización			
	AT (80°C, 6 h)	BT (60°C, 10 h)		
		Tiempo de acondicionamiento a 50°C (h)		
		0	24	48
2	1596 ± 266	1466 ± 171	1139 ± 245	967 ± 113
3	1130 ± 144	1333 ± 31	1175 ± 310	1075 ± 104
4	1003 ± 188	1179 ± 271	935 ± 79	909 ± 225
5	761 ± 47	954 ± 144	1186 ± 74	1136 ± 118

* Paja seca 1872 ± 144 mg /kg. lote 1

* Paja seca 1838 ± 215 mg /kg. lotes 2 y 3

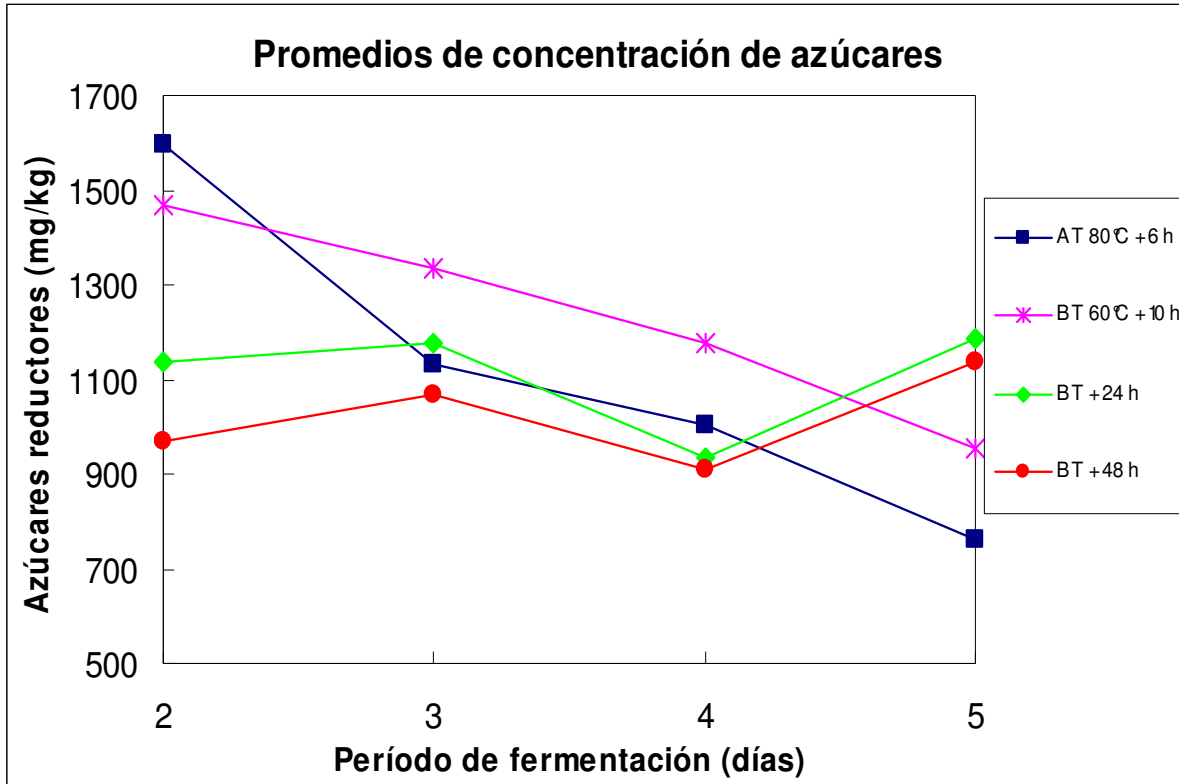


Figura 29. Azúcares reductores en los sustratos (mg /kg sustrato seco) a diferentes períodos de fermentación, promedio de los lotes 1, 2 y 3, sometidos a una pasteurización de AT (80°C/6 h) o BT (60°C/10 h + 50°C/0, 24 y 48 h).

En estos experimentos se encontró en todos los sustratos una disminución paulatina en la concentración de azúcares reductores al avanzar el período de fermentación, independientemente de las condiciones de pasteurización (AT o BT) (**Tablas 13 y 14; Figuras 25 y 26**). Sin embargo, en los sustratos con un tratamiento térmico de BT, no se detectaron cambios en la concentración de azúcares con los períodos extras de acondicionamiento de 24 ó 48 h (**Tablas 15 y 16; Figuras 27 y 28**). Este fenómeno podría atribuirse a la presencia de microorganismos que invaden el sustrato durante la fermentación, ya que conforme ésta avanza su diversidad y cantidad también cambia. La actividad de esta microbiota explicaría la disminución gradual en el contenido de azúcares de fácil asimilación observada durante la fermentación. Tal sucesión de microorganismos continuaría durante el acondicionamiento. Se presentarían así organismos capaces de desdoblar grandes moléculas como polisacáridos con la consecuente formación de monosacáridos, simultáneamente con aquellos organismos que consumen azúcares simples,

explicando porque la concentración de azúcares reductores no sufrió cambios importantes durante el acondicionamiento.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gray *et al.* (1971) Fermor *et al.*, (1979) y Shim (2002), quienes reportaron un aumento exponencial en la diversidad y cantidad de microorganismos mesófilos y termófilos durante las primeras 24 y 48 h de fermentación al aire libre. Fermor *et al.*, (1979) reportaron adicionalmente una disminución significativa en la concentración de azúcares solubles durante las primeras 24 h de fermentación, estos azúcares no sufrieron cambios substanciales en su concentración durante el resto del período de fermentación.

En este contexto, Stölzer y Grabbe (1991) observaron que la exposición del sustrato a altas temperaturas de pasteurización (75 ó 85°C) causa la liberación de azúcares como la glucosa, permitiendo el crecimiento micelial tanto de *Pleurotus* como de otros organismos competidores y antagonistas. Estos autores postulan que azúcares como la glucosa son fuentes de carbono fácilmente disponibles para los microorganismos contaminantes. Posteriormente explican que en los sustratos pasteurizados a 65°C, el contenido de azúcares simples se incrementó al inicio de la incubación, pero después de 24 h estos azúcares fueron completamente metabolizados por las bacterias termófilas que invaden el sustrato, lográndose con estas temperaturas exclusivamente el desarrollo de *Pleurotus*. Concluyen, que la producción de sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus* es posible por que los hongos basidiomicetes poseen la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar los complejos lignocelulósicos de la paja, mientras que los microorganismos competidores dependen principalmente de los nutrientes (azúcares solubles) de fácil asimilación.

Algunos autores recomiendan utilizar exclusivamente los procesos de fermentación para aquellos sustratos que contienen cantidades considerables de sustancias fermentables. Materiales como las pulpas, bagazos y desechos de frutos entre otros, son más susceptibles a contaminaciones bacterianas, fúngicas e invasiones de insectos, por lo que necesitan ser homogenizados y estabilizados utilizando diferentes sistemas y períodos prolongados de

fermentación para su posterior manejo y aprovechamiento (Guzmán-Dávalos y Soto-Velasco, 1989; Villa-Cruz, 1999; Soto-Velasco *et al.*, 1991; Muez-Ororbía y Pardo-Núñez, 2001).

Los resultados de esta investigación nos permiten sugerir, que en sustratos como la paja de trigo, donde la cantidad de azúcares simples no es tan abundante como en pulpas y bagazos. No obstante, es recomendable implementar un pretratamiento del sustrato con períodos cortos (2 días) de fermentación a 50°C. Bajo estas condiciones se logra una considerable disminución en la concentración de azúcares reductores así como otros cambios físico-químicos y biológicos que proporcionan cierta selectividad a los sustratos. Se obtienen así desarrollos vegetativos apropiados (**Figura 10**), disminuyendo los riesgos de contaminación (**Tabla 9** y **Figura 24**), y se hacen más accesibles los carbohidratos de los cuales se nutre *Pleurotus*, lográndose mayores producciones de cuerpos fructíferos (**Tabla 18**).

Guzmán *et al.*, (1993) sugieren de igual forma que previo a la pasteurización, “no es recomendable” utilizar procesos de fermentación en sustratos como las pajas y plantean que este tratamiento se utilice “únicamente” en aquellos materiales que poseen grandes cantidades de azúcares y fenoles solubles. Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos durante los experimentos de esta investigación, aun y cuando existió un consumo de azúcares solubles principalmente al inicio de la fermentación, la concentración de éstos se mantuvo sin cambios importantes el resto del período de fermentación y en el caso de los sustratos pasteurizados a BT permanecieron constantes durante el acondicionamiento. Estos azúcares de fácil asimilación pudieron ser aprovechados, tanto por *Pleurotus* como por los microorganismos antagonistas y/o contaminantes. Complementando este planteamiento, con los resultados del porcentaje de contaminación durante el desarrollo micelial (**Tabla 9** y **Figura 24**) nos permiten inferir que cuando se extendió el período de fermentación a 4 ó 5 días en los 3 lotes estudiados, se presentaron condiciones que favorecen una mayor invasión y porcentaje de agentes contaminantes. Este fenómeno se debió probablemente a que los sustratos con estos tiempos de fermentación presentan una buena cantidad de

nutrientes (azúcares simples). Esto permitiría que el número y diversidad de microorganismos sea muy abundante, haciendo más difícil su eliminación por procesos de pasteurización, aunado a la capacidad de algunas esporas de microorganismos termófilos a sobrevivir a condiciones de altas temperaturas, y que al germinar pueden competir con el micelio de *Pleurotus*, como ha sido reportado en los trabajos de Gray *et al.*, (1971), Fermor *et al.*, (1979) y Shim (2004).

En este orden de ideas, Houdeau *et al.*, (1991) encontraron un incremento en el desarrollo de microorganismos antagonistas de *Pleurotus*, tales como *Trichoderma*, *Trichurus* y *Stysanus* entre otros, que se establecieron en la paja de trigo como consecuencia al incremento en las temperaturas dentro del sustrato durante la incubación, debido principalmente a la presencia de elementos solubles como azúcares simples, los cuales no fueron eliminados por un pretratamiento del sustrato.

7.3.4 Producción de cuerpos fructíferos.

De acuerdo al planteamiento experimental, en los 3 lotes experimentales se evaluó el efecto que tiene un tiempo corto vs uno largo de fermentación, así como el tratamiento térmico de pasteurización, sobre la selectividad del sustrato y eficiencia biológica. Para este objetivo, se utilizaron únicamente los sustratos fermentados por 2 ó 5 días y pasteurizados con alta o baja temperatura para producir cuerpos fructíferos. En la **Tabla 18**, se presenta la producción acumulada de cuerpos fructíferos en los lotes 1, 2 y 3.

En los sustratos del lote 1 y pasteurizados a AT, se obtuvieron valores similares de producción de esporóforos sin diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), con 2 ó 5 días de fermentación, obteniendo 57.5 y 54.2 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco, respectivamente. En los sustratos pasteurizados a BT y fermentados por 2 días, se obtuvo la mayor producción de basidiomas con diferencias significativas al producirse 73.3 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco (**Tablas 18, 35, 58 y 59 Anexo**). En este caso, la

producción de cuerpos fructíferos en los sustratos fermentados por 5 días fue de 53.4 g de hongos frescos/100 g, parecida a los rendimientos obtenidos en los sustratos pasteurizados a AT (**Tabla 18**).

Tabla 18. Producción acumulada de esporóforos (g de hongos frescos/ 100g de sustrato seco) de *P. ostreatus* y promedios, con 2 y 5 días de fermentación, con pasteurización (AT) = 80°C/6 h, y (BT) = 60°C/10 h + 50°C/48 h (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación del sustrato (Días)	lotes	Condiciones de Pasteurización y Acondicionamiento			
		AT		BT + 48 h	
2	1	*57.5 ^b ± 8.8	41.1 ^a ± 11.6	73.3 ^b ± 7.1	63.5 ^c ± 7
	2	32.1 ^a ± 11.7		59.6 ^a ± 9.4	
	3	*33.8 ^a ± 16.2		57.6 ^a ± 5.6	
5	1	54.2 ^b ± 7.6	49.1 ^{ab} ± 8.8	*'53.4 ^a ± 7.9	54 ^{ab} ± 1.6
	2	38.9 ^a ± 10.5		*55.9 ^a ± 15.3	
	3	*54.1 ^b ± 17.0		52.8 ^a ± 15.2	

^{a,b} Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $\alpha_{0.05}$)

* 10% de contaminación

*' 20% de contaminación

Como se observa en la **Tabla 18**, en el lote 2 los sustratos pasteurizados con AT y fermentados con 2 ó 5 días, presentaron las menores producciones de hongos con diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) de la mayoría de los experimentos analizados (**Tablas 18; 36, 58 y 59 Anexo**), en estos sustratos se obtuvieron rendimientos de 32.1 y 38.9 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco, respectivamente. En contraparte, los rendimientos de cuerpos fructíferos de los sustratos de este lote correspondientes a la pasteurización a BT con 2 y 5 días de fermentación (59.6 y 55.9 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco, respectivamente) fueron significativamente mayores que los pasteurizados a AT (**Tablas 18; 35; 58 y 59 Anexo**).

En el lote 3, el rendimiento obtenido con el sustrato pasteurizado a AT y con 2 días de fermentación (33.8 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco) se encuentra dentro del grupo

de sustratos con las producciones significativamente mas bajas y fue estadísticamente menor que el obtenido con el sustrato fermentado por 5 días (54.1 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco), el cual no mostró diferencias significativas respecto a los rendimientos producidos por los sustratos pasteurizados a BT, ya sea con 2 ó 5 días de fermentación (57.6 y 52.8 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco) (**Tabla 18**).

En la **Tabla 18**, se presentan también los promedios de producción en los 3 lotes experimentales para cada una de las condiciones de pasteurización y períodos de fermentación. Los sustratos pasteurizados a AT produjeron los rendimientos mas bajos ya sea con 2 ó 5 días de fermentación (41.1 y 49.1 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco), los cuales no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos con los sustratos pasteurizados a BT con 5 días de fermentación (54 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco). No obstante, es importante recalcar que los sustratos pasteurizados a BT con 2 días de fermentación, se obtuvieron rendimientos significativamente superiores al resto de los tratamientos (63.5 g de hongo fresco/100 g de sustrato seco) (**Tablas 18, 37, 58 y 59**).

Es de hacer notar que en los sustratos fermentados por períodos cortos (2 días/50°C) y pasteurizados a BT (60°C) con 48 h de acondicionamiento a 50°C, no únicamente se obtuvieron los mayores rendimientos, también en algunos casos presentaron un mejor desarrollo micelial, asimismo fueron los únicos que no sufrieron la irrupción de agentes contaminantes. Esto sugiere que probablemente las modificaciones físico-químicas y biológicas que se producen como resultado de la actividad de los diversos microorganismos que invaden el sustrato bajo las condiciones de este tratamiento, resultan en una transformación idónea del sustrato para el cultivo de *Pleurotus*.

Los resultados anteriores concuerdan con los estudios de Contreras *et al.*, (2004) que reportan eficiencias biológicas del 37% para sustratos sin tratamiento, incrementándose a 92.5% en sustratos sumergidos en agua por períodos cortos (48 h). De igual forma, Hernández *et al.* (2003) reportaron que los sustratos con períodos cortos de fermentación

(24-72 h) producen mayores eficiencias biológicas (80%) que las obtenidas en sustratos sin ningún tipo de tratamiento previo.

En el mismo sentido, es posible interpretar los menores rendimientos que se obtuvieron con los sustratos fermentados por períodos largos (5 días) ya sea pasteurizados a AT o BT, en los cuales se observó adicionalmente un incremento en la contaminación es decir, su selectividad fue menor. Estos resultados, hacen poco recomendable el uso de períodos largos de fermentación, ya que incrementar el tiempo no repercute en sustratos más selectivos y sí en una mayor posibilidad de fracaso y costo del proceso (**Tabla 18 y Figura 24**).

Reforzando este planteamiento, algunos autores han encontrado que con períodos de fermentación largos se afecta la eficiencia biológica. Philippoussis *et al.*, (2001) encontraron mejores rendimientos de *Pleurotus* en sustratos de paja sometidos a un pretratamiento de inmersión en agua por 24 h, comparados con los sustratos con un mismo tiempo de inmersión, pero adicionalmente fermentados por períodos de 12 días. De igual forma, Schies y Lelley (1989) observaron que la invasión micelial *P. ostreatus* era mejor cuando el sustrato fue fermentado por 7 ó 14 días que con períodos más largos de fermentación (21 días), mientras que en esta última condición aumentaba la presencia de microorganismos contaminantes en el sustrato. Así mismo, Martínez-Carrera *et al.*, (1985) utilizaron mezclas (2:1) de pulpa de café con paja y obtuvieron eficiencias biológicas de 100% en los sustratos fermentados por períodos de 5 días, que disminuyeron al 40% su producción si el tiempo de fermentación se prolongaba a 10 días; finalmente con sustratos fermentados por períodos de 20 días, el crecimiento y colonización del micelio fue muy pobre y los rendimientos nulos.

Es importante mencionar que los rendimientos obtenidos en esta etapa de la investigación fueron considerablemente menores que los obtenidos en los experimentos a escala industrial, esto se debió probablemente a las diferencias en las condiciones de incubación y fructificación. En la primera etapa de la investigación los sustratos se llevaron a fructificar

en el Laboratorio de Hongos Comestibles del conjunto E de la Facultad de Química, de la UNAM, donde las principales condiciones ambientales como humedad, temperatura, aireación y riegos están controlados mediante sistemas automatizados, lo que proporciona un ambiente propicio para el buen desarrollo micelial y producción de cuerpos fructíferos, repercutiendo en mejores eficiencias biológicas.

Por otra parte, durante la segunda etapa de la investigación a escala laboratorio, por cuestiones de logística y por la implementación del sistema para el control de las condiciones de fermentación y pasteurización, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de Hongos comestibles de la UAM-I donde no se cuenta con sistemas adecuados para el control ambiental. No obstante que de forma manual se trató de mantener en un intervalo adecuado, no siempre se logró este propósito, registrándose fluctuaciones en la humedad, aireación y temperatura lo que seguramente ocasionó disminuciones en la producción de cuerpos fructíferos. Los rendimientos obtenidos con sustratos de los lotes 1, 2 y 3 en los experimentos a escala laboratorio, nos proporcionan sin embargo, información relevante acerca de las características que adquieren los sustratos para una eficiente producción de *Pleurotus*. En este sentido, es importante mencionar que la mayoría de los rendimientos obtenidos en los diferentes lotes de esta investigación fueron aceptables, tomando en cuenta que autores como Patra y Pani (1995) plantean que 50% de eficiencia biológica se considera como un mínimo aceptable para la producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*.

7.3.5 Evaluación del efecto de las condiciones de procesamiento del sustrato sobre la producción de cuerpos fructíferos.

En general, nuevamente se presentaron diferencias entre los resultados del lote 1 y los lotes 2 y 3, que fueron evidentes entre el contenido de azúcares reductores, la producción de cuerpos fructíferos y los porcentajes de producción por brote en cada uno de los 3 lotes analizados. Por una parte, en los sustratos del lote 1 con 2 días de fermentación y pasteurización de BT más 48 h de acondicionamiento, se registró una concentración de

azúcares reductores relativamente baja (1097 mg/kg), con la mayor producción de cuerpos fructíferos de todos los experimentos, 73.3 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco (**Figuras 30 y 32**).

Adicionalmente estos sustratos en particular, posiblemente se presentaron las mejores condiciones y características del sustrato que podrían estar relacionadas con el tipo de paja, tales como estructura, diversidad de microorganismos, contenido de azúcares, así como cambios fisicoquímicos y biológicos que ocurrieron especialmente con este pretratamiento, y que probablemente influyeron para lograr en estos sustratos una mayor invasión micelial y eficiencia biológica, expresados en una mayor producción y porcentaje de esporóforos en un menor número de cortes, presentándose al 1^{er} corte un 66% de la cosecha y en el 2^o corte un 91% de la producción total (**Tabla 25**).

En este sentido, los sustratos con una pasteurización de AT y 2 días de fermentación presentaron una mayor concentración de azúcares con 1515 mg/kg, y una menor producción de cuerpos fructíferos de 57.5 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco (**Figuras 30 y 32**). Contrario a los sustratos pasteurizados a BT, los sustratos con este tratamiento térmico presentaron una menor producción y porcentaje de basidiomas por brote, al producir un 44 y 69% al 1^{er} y 2^o corte respectivamente, de la producción total (**Tabla 25**).

Por otra parte, los sustratos con 5 días de fermentación y con una pasteurización de AT, presentaron una menor concentración de azúcares reductores comparada con los sustratos pasteurizados a BT. Sin embargo, esta característica no presentó un efecto sobre la producción de cuerpos fructíferos, ya que ésta fue similar a la de los sustratos pasteurizados a AT y BT con 2 y 5 días de fermentación, respectivamente (**Figuras 31 y 33**).

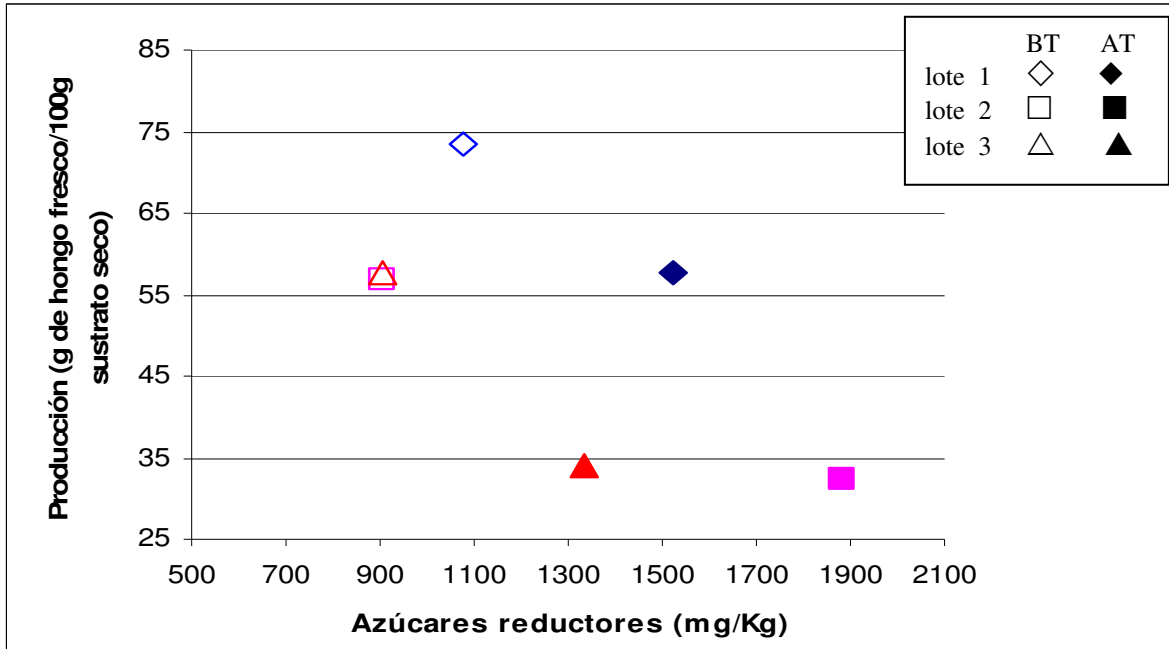


Figura 30. Concentración de azúcares reductores (mg/kg de sustrato seco) y producción de esporóforos (g de hongos frescos/100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus* en sustratos fermentados 2 días, con una pasteurización a (BT) o (AT) (lotes 1, 2, 3).

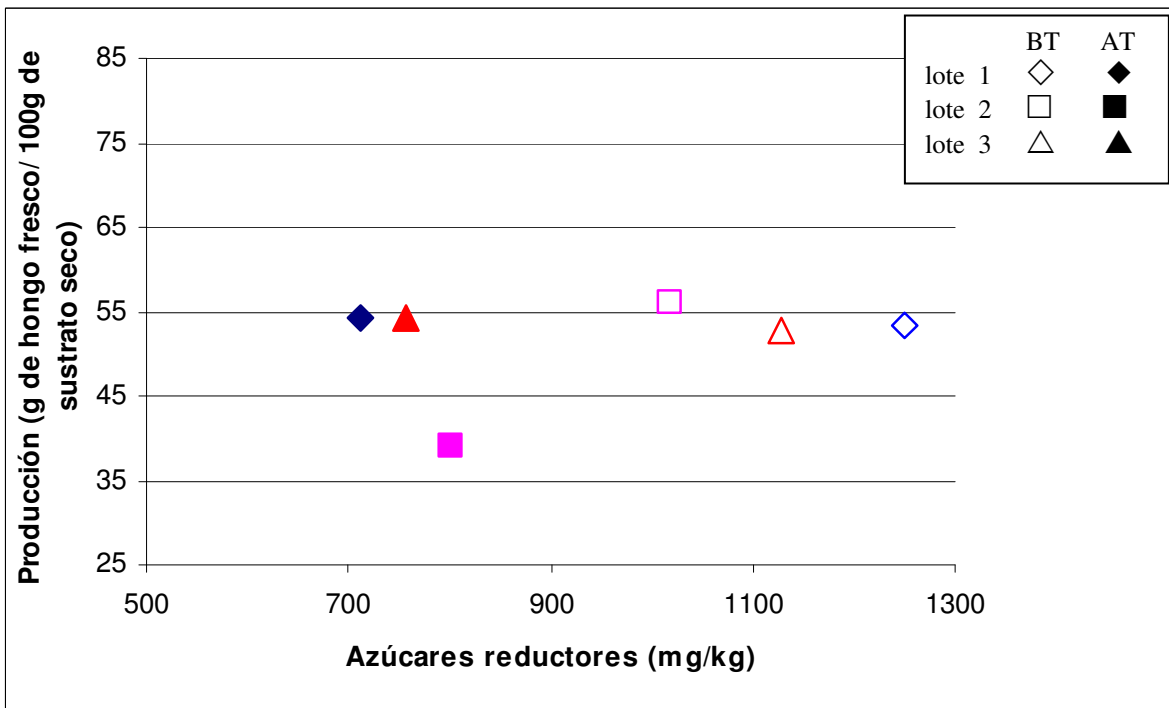


Figura 31. Concentración de azúcares reductores (mg/kg de sustrato seco) y producción de esporóforos (g de hongos frescos/100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus* en sustratos fermentados 5 días, con una pasteurización a (BT) o (AT) (lotes 1, 2, 3).

No obstante, al evaluar la producción de esporóforos por brote sí se presentaron variaciones importantes entre ambos tratamientos del sustrato (AT o BT). Los sustratos pasteurizados a AT y 5 días de fermentación presentaron una producción del 33% al 1^{er} corte y 56% al 2^o corte, valores considerablemente menores comparado con los resultados de los sustratos fermentados con el mismo tiempo pero pasteurizado a BT, donde el valor fue de 59 y 94% de su producción total al primer y segundo corte, respectivamente (**Tabla 25**).

En los lotes 2 y 3, los sustratos pasteurizados con BT, no presentaron variaciones importantes en la concentración de azúcares durante el acondicionamiento. Sin embargo, los sustratos con 2 días de fermentación presentaron en ambos lotes las menores concentraciones de azúcares simples con 907 y 896 mg/kg respectivamente, y las mejores producciones de cuerpos fructíferos siendo estas de 59.6 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco en el lote 2, y 57.6 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco, en el lote 3 (**Figuras 30 y 32**). Para estos mismos sustratos los valores de producción por brote no fueron tan diferentes comparados con los sustratos fermentados por 5 días o independientemente de la temperatura de pasteurización, presentándose en los sustratos con 2 días de fermentación al 1^{er} corte un 47 y 42%, mientras que al 2^o corte presentaron un 78 y 69% del total de la producción final, respectivamente (**Tabla 25**).

Como se puede observar en las **Figuras 30, 31, 32 y 33**, en estos lotes 2 y 3 pasteurizados con BT, no se presentaron diferencias significativas entre los valores de producción de los sustratos con 2 y 5 días de fermentación. Produciendo los sustratos con 5 días de fermentación, 55.9 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco el lote 2 y 52.8 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco, el lote 3. Es importante recalcar que para estos lotes, como ya se había mencionado con anterioridad, tampoco se encontraron diferencias importantes en la producción por corte, obteniéndose un 41% y 49% al 1^{er} corte y un 71% y 77% al 2^o de la producción total, respectivamente (**Tabla 25**).

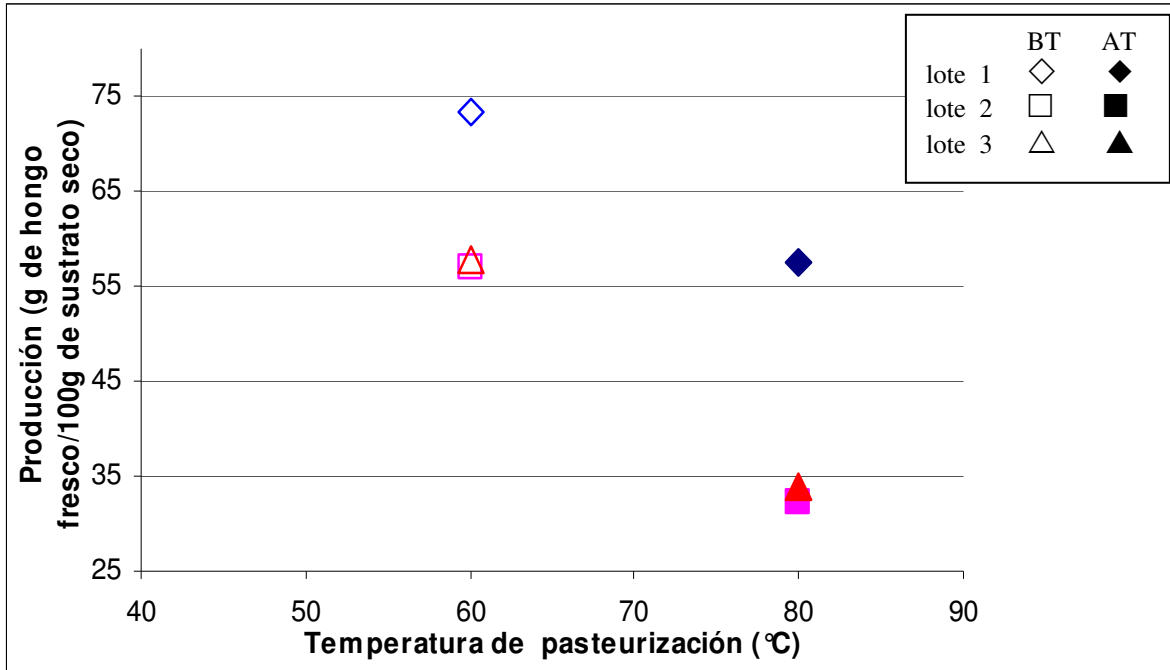


Figura 32. Producción de esporóforos (g de hongos frescos/100 g de sustrato seco) en sustratos fermentados 2 días y pasteurizados a (BT) o (AT) (lotes 1, 2, 3).

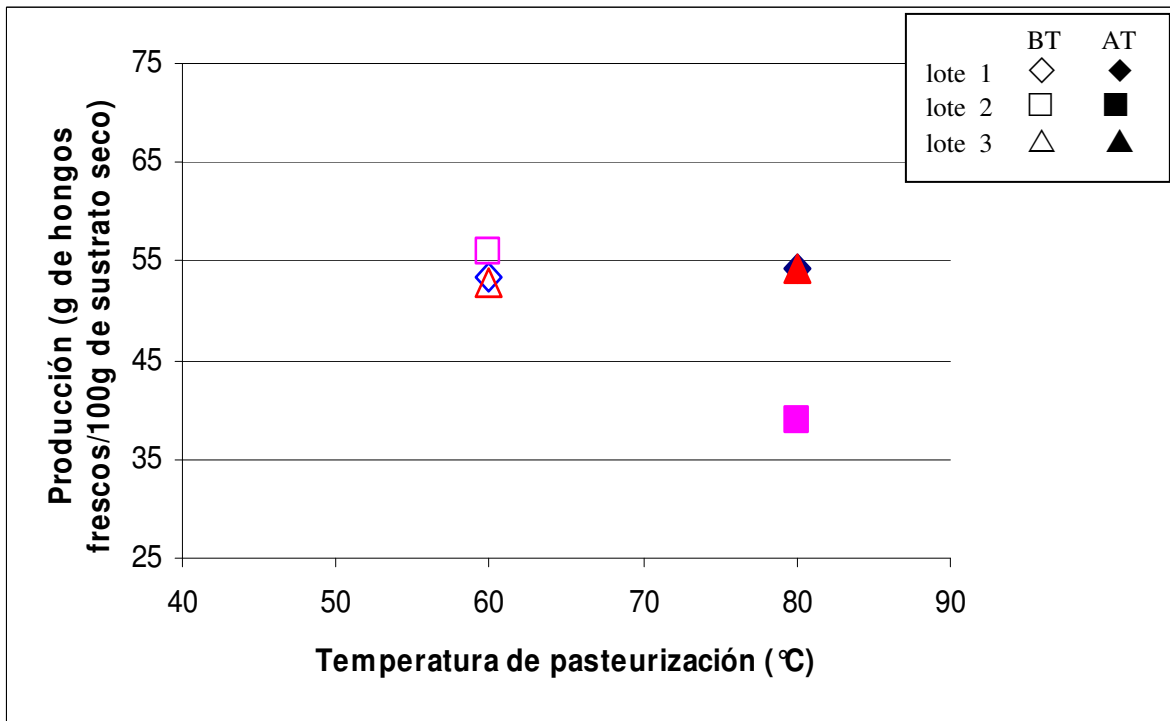


Figura 33. Producción de esporóforos (g de hongos frescos/100 g de sustrato seco) en sustratos fermentados 5 días y pasteurizados a (BT) o (AT) (lotes 1, 2, 3).

Tabla 25. Producción por corte (%) respecto a la producción total acumulada de *P. ostreatus* con 2 y 5 días de fermentación, pasteurizados a AT (80°C/6 h), y BT (60°C/10 h + 50°C/48 h) lotes 1, 2 y 3.

Período de fermentación del sustrato (días)	lotes	Condiciones de pasteurización y acondicionamiento			
		AT		BT + 48 h	
		(% por corte)		(% por corte)	
		1	2	1	2
2	1	44.3	69.6	66.6	91.4
	2	44.5	81.9	48.0	78.7
	3	53.5	85.5	42.5	69.1
5	1	33.3	56.1	59.2	94.6
	2	32.3	81.2	41.9	71.0
	3	41.6	62.5	49.6	77.1

Finalmente, en los sustratos con un tratamiento de pasteurización a AT de los lotes 2 y 3, se observó un efecto “negativo” entre el contenido de azúcares simples y la producción de cuerpos fructíferos, en ambos períodos de fermentación. Así los sustratos con 2 días de fermentación de ambos lotes presentaron un alto contenido de azúcares reductores, con los menores valores de producción de cuerpos fructíferos de todos los experimentos (**Figuras 30 y 32**). Al extender el período de fermentación a 5 días, en el lote 3, se presentó una tendencia similar a la del lote 1, ya que la concentración de azúcares fue menor, comparada con los sustratos pasteurizados a BT. No obstante, como se indica en las **Figuras 31 y 33** no se observó una interacción entre la concentración de azúcares y la producción de basidiomas presentando valores similares a los de los sustratos pasteurizados a BT, e inclusive para el lote 2 la eficiencia biológica disminuyó a 38.9 g de hongos frescos/100 g de sustrato seco. En estos sustratos de igual forma no se observaron diferencias importantes de producción por brote, entre los diferentes períodos de fermentación y temperaturas de pasteurización (**Tabla 25**).

7.3.6 Humedad y pH.

Para el lote 1, la humedad del sustrato se mantuvo entre el 70 y 80%, durante los diferentes días de fermentación en ambos tratamientos de pasteurización. Registrando un valor de 77% en los sustratos con 2 días de fermentación y pasteurizados a BT. El contenido de humedad en los sustratos de los lotes 2 y 3 también fue parecido entre sí, ambos lotes presentaron valores de alrededor del 75%. A excepción del lote 2, en los sustratos con una pasteurización a AT y 2, 3, y 4 días de fermentación, donde se obtuvieron porcentajes menores de alrededor del 65%. Para los sustratos con un tratamiento de pasteurización a BT con 3 y 4 días de fermentación se registraron porcentajes mayores, cercanos al 85% (**Tabla 26**). De acuerdo con algunos estudios previos, se recomienda en el sustrato una humedad de entre el 70 y 80%, para el buen desarrollo micelial y producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*. Los sustratos que se utilizaron en estos experimentos presentaron valores dentro de estos intervalos (Guzmán *et al.*, 1993; Hernández, 2003).

Tabla 26. Humedad (%) a diferentes períodos de fermentación sometido a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6h, BT = 60°C/10h). El sustrato pasteurizado a BT (60°C/10h) se acondicionó a 50°C/0, 24 ó 48h (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	Condiciones de fermentación											
	AT (80°C 6 h)			BT (60°C, 10 h)								
				0 h			24 h			48 h		
	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3
2	73	68	73	70	70	70	72	70	70	77	73	69
3	73	65	75	69	71	73	73	76	72	78	85	72
4	72	67	76	79	75	75	70	78	75	79	80	75
5	78	72	76	80	68	76	78	68	75	78	75	71

En lo que respecta al pH, en los sustratos del lote 1 se presentaron valores alrededor de 9 durante las diferentes etapas de tratamiento del sustrato e independientemente de las condiciones de pasteurización. Los valores de pH en los lotes 2 y 3 fueron básicos. Los resultados en los tratamientos de AT fluctuaron entre 8.4 y 9.3, y en los sustratos sometidos a BT presentaron valores entre 8.9 y 9.0 en ambos lotes (**Tabla 27**). Estos resultados con

valores básicos probablemente fueron consecuencia de la producción de amoníaco, debido principalmente a la actividad metabólica de los microorganismos al interconvertir algunas proteínas.

En este orden de ideas, se ha sugerido por diversos autores que un medio alcalino en el sustrato reduce considerablemente la invasión y proliferación de microorganismos competidores (Stölzer y Grabbe, 1991; Shim, 2002), proponiéndose en este sentido que un pH con estas características afecta el crecimiento de agentes contaminantes tales como Deuteromycetes, *Trichoderma* y *Verticillium*, entre otros, y no el de *Pleurotus* (Staments y Chilton, 1983; Villa-Cruz *et al.*, 1999; Hernández, 2003).

Tabla 27. pH del sustrato* a diferentes períodos de fermentación sometidos a 2 condiciones de pasteurización (AT = 80°C/6h, BT = 60°C/10h). El sustrato pasteurizado a BT (60°C/10h) se acondiciona a 50°C/0, 24 ó 48h (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	Condiciones de pasteurización											
	AT (80°C, 6 h)			BT (60°C, 10 h)								
				0 h			24 h			48 h		
	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3	lote1	lote2	lote3
2	8.8	8.9	9.3	9.1	8.9	8.9	7.1	8.7	9.1	8.7	9.2	9.3
3	9	8.4	8.4	9.3	9.0	9.0	9.1	9.1	9.3	9.2	8.9	9.2
4	7.9	8.5	9.0	8.7	9.3	8.7	9.2	9.3	9.0	8.9	9.1	9.2
5	9.2	9.1	8.9	9.3	9.4	9.0	9.1	9.4	9.3	9.2	8.4	9.5

* Paja seca 6.5

7.3.7 Temperaturas de fermentación.

La temperatura que se registró en el sustrato durante la fermentación, fue un factor que se tomó en cuenta para poder determinar la evolución de dicho proceso, en este sentido se puede observar en la **Tabla 28**, al inicio del proceso de fermentación el sustrato presentó temperaturas alrededor de 40°C en la parte superficial del sustrato y un promedio de 45°C en la parte interna. No fue hasta las 48 h de fermentación cuando se logró una temperatura

cercana a los 50°C. Con un promedio general de temperaturas al interior del sustrato y superficial alrededor de los 50°C, para el resto del proceso de fermentación en los 3 lotes. Esto permitió asegurar que las temperaturas en el sustrato durante esta etapa de fermentación se mantuvieron casi constantes lo que reafirmó que las condiciones del tratamiento en los diferentes lotes tuvieran cierta uniformidad y al mismo tiempo mantuvieron un gradiente con cierta reproducibilidad.

Stölzer y Grabbe (1991) discuten la importancia de un tratamiento térmico (fermentación) entre 50 y 60°C previo a la siembra del sustrato y proponen que estos procesos tienen una influencia decisiva en la selectividad del sustrato. Las temperaturas que presentó la paja durante el tratamiento de fermentación, fueron satisfactorias para una buena evolución del mismo (Villa Cruz *et al.*, 1999). Con la fermentación se obtiene un ablandamiento de la fibra que contiene la paja, lo cual beneficia la retención de humedad, además que se reducen otros compuestos no deseados como azúcares solubles, taninos, fenoles, ácidos, resinas, etc. (Guzmán *et al.*, 1993). Se logró por una parte temperaturas por arriba de los 50°C y por otra, una buena aireación lo que permitió que se llevara a cabo una mejor convección y que se presentará en el sustrato un eficiente metabolismo de los microorganismos, que consintió en el consumo de los azúcares solubles de fácil asimilación. Estas temperaturas concuerdan con lo obtenido por Hernández *et al.*, (2003) al utilizar una fermentación de 5 días como tratamiento del sustrato.

Tabla 28. Temperaturas registradas en el sustrato durante el proceso de fermentación (lotes 1, 2, 3).

Tiempo de tratamiento del sustrato (h)	Temperatura (°C)							
	lote 1		lote 2		lote 3		Promedios	
	Interna	Superior	Interna	Superior	Interna	Superior	Interna	Superior
24	45.3 ± 3.2	42.6 ± 1.6	43.4 ± 2.4	41.6 ± 3.1	44.7 ± 3.1	40.5 ± 2.3	44.5 ± 1.0	41.6 ± 1.1
48	53.8 ± 4.1	49.3 ± 8.1	54.4 ± 1.2	47.7 ± 7.8	41.6 ± 2.9	51.3 ± 1.9	49.9 ± 7.2	49.4 ± 1.8
72	51.9 ± 1.4	46.1 ± 1.7	51.9 ± 1.9	43.4 ± 4.4	48.0 ± 1.6	52.9 ± 0.6	50.6 ± 2.3	47.5 ± 4.9
96	54.7 ± 0.3	52.1 ± 2.7	50.6 ± 0.2	50.9 ± 1.9	49.5 ± 0.5	51.5 ± 1.7	51.6 ± 2.7	51.5 ± 0.6
120	54.1 ± 0.7	51.7 ± 2.9	52.4 ± 3.2	51.5 ± 2.9	50.4 ± 1.7	52.0 ± 1	52.3 ± 1.9	51.8 ± 0.3

8 CONCLUSIONES

Los objetivos planteados en esta investigación, relacionados con identificar los parámetros de procesamiento de sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, que incluyen la implementación de un sistema eficaz de pretratamiento (fermentación, pasteurización-acondicionamiento), los cuales producen cambios físico-químicos y biológicos benéficos en el sustrato, se lograron con los resultados de este trabajo. En este sentido, es importante emplear procedimientos que produzcan bajos niveles de azúcares reductores para lograr selectividad en el sustrato, es decir, sustratos en los que el micelio de *P. ostreatus* pueda desarrollarse más rápidamente que el micelio de mohos contaminantes y antagonistas. De los experimentos realizados en esta investigación se puede concluir que:

A escala industrial.

La información obtenida en esta etapa de la investigación resultó de gran valor. En ambos lotes se observó selectividad en el sustrato, encontrando un bajo porcentaje de contaminación en las evaluaciones de crecimiento micelial y en los sustratos utilizados para la producción de cuerpos fructíferos, ninguna. Los rendimientos fueron aceptables en ambos lotes experimentales.

La concentración de azúcares simples no presentó cambios importantes durante el período de fermentación, para posteriormente disminuir e incrementarse durante la pasteurización-acondicionamiento, respectivamente. No se observó un efecto del tiempo de fermentación sobre el desarrollo micelial de *P. ostreatus*. Al final del acondicionamiento la invasión micelial se incrementó.

Los distintos períodos de tratamiento del sustrato: fermentación, pasteurización-acondicionamiento fueron demasiado largos, asimismo, no se estandarizaron tomándose normalmente decisiones relacionadas con su diseño y duración, con un alto grado de empirismo lo que implica mayores riesgos de fracaso y gastos de producción.

Los rendimientos de los sustratos producidos a escala industrial, fueron mayores comparados con los resultados obtenidos a escala laboratorio, esto probablemente debido a las diferencias en las condiciones ambientales y de instalaciones, durante los períodos de incubación y fructificación entre ambos experimentos. No obstante, los sustratos producidos bajo los dos métodos (industrial y laboratorio) presentaron eficiencias biológicas aceptables.

A escala laboratorio.

Fue posible tener una continuidad en la toma de muestras, al mismo tiempo que se lograron controlar variables como temperatura, humedad y aireación (volteos), así como, en la duración de las etapas de fermentación, pasteurización y acondicionamiento. Aun y cuando se consiguieron controlar las condiciones antes mencionadas existió variabilidad experimental entre los 3 lotes analizados.

Las características del sustrato (paja de trigo) tales como, procedencia (región geográfica y tipo de suelo), tiempo de cosecha y almacenamiento (“recientes vs viejas”), disponibilidad y cantidad de nutrientes, diversidad de microorganismos, uso de pesticidas, etc., afectan la selectividad del sustrato.

El desarrollo micelial, presentó valores semejantes durante los primeros días de fermentación. El crecimiento vegetativo disminuyó al mismo tiempo que aumentó la incidencia de contaminación, cuando la fermentación se prolongó.

La concentración de azúcares, propicio diferentes efectos sobre el porcentaje de contaminación y producción de cuerpos fructíferos, excepto sobre el desarrollo micelial. En este sentido, la concentración y disponibilidad de azúcares reductores, también podrían tener una marcada influencia sobre la diversidad y cantidad de microorganismos que se establecen en el sustrato durante las distintas etapas de tratamiento del sustrato (fermentación, pasteurización-acondicionamiento), los microorganismos podrían afectar negativamente o positivamente la selectividad del sustrato.

Los sustratos fermentados por 2 días más 48 h de acondicionamiento, y pasteurizados a BT, presentaron un alto grado de selectividad, quedando exentos de contaminación tanto los experimentos de desarrollo micelial como en los de producción de cuerpos fructíferos.

Los sustratos pasteurizados a AT y sometidos a esterilización fueron menos selectivos, presentando mayor frecuencia y porcentaje de contaminación a través de los diferentes días de fermentación, tanto en los experimentos de desarrollo micelial como en los de producción de cuerpos fructíferos. Se presentó un menor porcentaje de contaminación en los sustratos no esterilizados. Estos resultados nos permiten especular acerca de la existencia de un “factor termosensible” que proporciona selectividad al sustrato, el cual sería afectado por los tratamientos con temperaturas de pasteurización por arriba de los 80°C o de esterilización.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se postula la existencia de un “factor termosensible”. Su naturaleza estaría por determinarse con precisión, pero podría resultar de la presencia de algún microorganismo o bien de la producción de algún metabolito secundario (vitaminas, antibióticos, hormonas, polisacáridos bacterianos, etc.). El “factor termosensible” tendría la capacidad de inhibir el desarrollo de organismos contaminantes o bien favorecer el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*.

Los sustratos sometidos a pasteurización de AT y BT, disminuyeron la concentración de azúcares simples al extenderse el período de fermentación, no se presentaron cambios significativos en la concentración de azúcares durante el acondicionamiento en los sustratos pasteurizados a BT.

Los sustratos sometidos a 2 días de fermentación a 50°C, y pasteurizados a BT 60°C (10 h), más 48 h de acondicionamiento a 50°C, muestran menores concentraciones de azúcares y mayores rendimientos. La concentración de azúcares reductores en los sustratos pasteurizados con AT afectó negativamente la selectividad del sustrato presentándose menores rendimientos y mayor contaminación.

Existió mayor producción de cuerpos fructíferos en los sustratos con 2 días de fermentación, pasteurizados a BT 60°C (10 h) y 48 h de acondicionamiento. No se presentaron diferencias en la producción de cuerpos fructíferos entre los sustratos pasteurizados con AT, independientemente del período de fermentación o si eran fermentados 5 días y pasteurizados a BT.

Finalmente, se recomienda utilizar períodos de 2 días de fermentación a 50°C, una pasteurización a BT 60°C (10 h) más 48 h de acondicionamiento a 50°C, para la elaboración de sustratos selectivos utilizados en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, estos sustratos son más eficientes y económicamente viables, asegurando una baja incidencia de contaminación y buenos rendimientos.

9 LITERATURA CITADA

Bello Mendoza, R., Sánchez-Vázquez, J. E. 1996. Anaerobic filter treatment of wastewater from mushroom cultivation upon coffee pulp. *World Journal Microbiology. Biotechnology.* 13: 51-55.

Calvo-Bado, L. 2001. Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas *In* Sánchez, E. J. & D. Royse (ed). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* ECOSUR MÉXICO. Pp. 69-79.

Contreras, E. P., Sokolov, M., Mejía, G., Sánchez, J. E. 2004. Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79 (2): 234-240.

Choi, K. W. 2004. Shelf cultivation of oyster mushroom. *Oyster Mushroom Cultivation. Mushroom Growers' Handbook 1. Mush World.* Pp160-167.

Fermor, T. R., Smith, J. F., Spencer, D. M. 1979. The microflora of experimental mushroom compost. *Journal of Horticultural Science* 54 (2): 131-147.

Gray, K. R., Sherman, K., Biddlestone, A. J. 1971. A review of composting-part 1. *Process Biochemistry* Pp 32-36.

Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. México DF.

Guzmán-Dávalos, L., Soto-Velazco, C. 1989. El cultivo de hongos comestibles como una alternativa en el uso de los desechos industriales de Jalisco. Universidad de Guadalajara. Guadalajara Jal. México. *Tiempos de Ciencia* 15: 35-40.

Hernández, D., Sánchez, J. E., Yamasaki, K. 2003. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology* 90: 145-150.

Houdeau, G., Olivier, J. M., Libmond, S., Bawadikji, B. 1991. Improvement of *Pleurotus* cultivation. In: Maher M. J. (ed) *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Balkema, Rotterdam. Pp. 549-554.

Huerta-Palacios, G., González, P. 2000. Optimización de la relación carbono nitrógeno en substrato fermentado para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Informe técnico Semestral 4/4 del proyecto 97-SIBEJ 05-13. ECOSUR. Tapachula, Chiapas, México. Sin publicar 15 p.

López, A., Sánchez, J. E., Bello., R. 1995. Quality of effluent water from the pasteurizing of coffee pulp. In: *Proceeding of the XVI International Conference on Coffee Science*. 7-14 April 1995. Int. Assoc. Coffee SC. Kyoto, Japan.

López, A., Huerta Palacios, G., Sánchez, J. E. 1996. Contamination encountered during various phases of cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Tropical Mexico. In: *Proceed. II Int. Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Daniel Royse (ed). Pennsylvania State University. USA. 299-348.

Martínez-Carrera, D., Guzmán, G., Soto, C. 1985. The effect of fermentation of coffee pulp in cultivation of *Pleurotus ostreatus* in México. *Mushroom Newsletter for the Tropics* 6 (1): 21-28.

Mata, G. 1992. The effect of substrate fermentation on the vegetative growth of *Lentinula boryanus* and *Lentinula edodes*. *Mushroom Research* 1 (1): 53-55.

Miller, L. M. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. Vol. 31. N° 3 426-428.

Muez-Ororbía, M., Pardo-Núñez, J. 2001. La preparación del sustrato. *In*: Sánchez, E. J. y D. Royse. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. ECOSUR MÉXICO.

Pardo Núñez, J., García Mendoza, C. 2002. Submerged fermentation of lignocellulosic wastes under moderate temperature conditions for oyster mushroom growing substrates. Mushroom Biology and Mushroom Products. Sanchez *et al* (eds). UAEM. Pp 271-277.

Patra, A. K., Pani, B. K. 1995. Evaluation of banana leaf as a new alternative substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation. Journal Phytopathological Research. 8:145-148.

Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P. 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 17: 191-200.

Schies, U., Lelley, J. 1989. Research on some aspects of semi-anaerobic fermentation. Mushroom Science XII (Part II). Proceedings of the Twelfth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi Braunschweig – Germany (FRG) 1987. Pp 199-205.

Scrase, R. 1996. Cultivating mushrooms: making composted and non-composted substrates. Mycologist. 10: 52-55.

Shim, M. S. 2002. The essence of mushroom cultivation-fermentation of substrate. Oyster Mushroom Cultivation. Mushroom Growers' Handbook 1. Mush World. Pp168-172.

Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L., Villaseñor, L. 1991. Substrates for cultivation of *Pleurotus* in Mexico in tequila maguey bagasse. *Mushroom Journal Tropics* 11: 34-37.

Stamets, P., Chilton, J. S. 1983. *The Mushroom Cultivator*. Olympia, Washington.

Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press.

Stölzer, S., Grabbe, K. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. *In: Maher M. J. (ed) Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Balkema, Rotterdam. Pp 141-146.

Straatsma, G., Gerits, J. G., Thissen, J. T., Amsing, J. G., Loeffen, H., Van Griensven, L. J. 2000. Adjustment of the composting process for mushroom cultivation based on initial substrate composition. *Bioresource Technology* 72: 67-74.

Vedder, P. J. C. 1996. *Cultivo moderno del champiñón*. Mundi-Prensa España.

Velázquez-Cedeño, M., Mata, G., Farnet, A-M., Savoie, J-M. 2006. (a). Estudio preliminar de la microflora bacteriana termotolerante de la pulpa de café y la paja de trigo con potencial de inhibición contra *Trichoderma viride* en el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología* 22: 33-39.

Velázquez-Cedeño, M., Farnet, A-M., Mata, G., Savoie, J-M. 2006. (b). Wheat straw management to produce a substrate improving the culture conditions of *Pleurotus*. *Environmental Biotechnology and Engineering. Proceedings of the Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering*. Mexico City. Mexico. Pp. 1-10

Villa-Cruz, V., Huerta-Palacios, G., Sánchez-Vázquez, J. E. 1999. Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micología Neotropical Aplicada* 12: 67-74.

10 ANEXO

Tabla 29. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación, sometidos a pasteurización de Baja Temperatura (60° C/10 h) y posterior- acondicionamiento a 50° C/48 h (lote 1).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
2	Estéril	3.5 ± 0.9	6.1 ± 0.9	8.8 ± 0.7	11.2 ± 0.7	12.6 ± 0.9
	Crudo	3.1 ± 0.6	5.7 ± 0.6	9.6 ± 0.4	12.8 ± 0.3	13.0 ± 0.0
3	Estéril	3.3 ± 0.5	3.5 ± 1.4	6.7 ± 0.4	9.0 ± 0.5	11.5 ± 0.7
	Crudo	1.0 ± 0.7	2.6 ± 0.5	5.5 ± 0.8	6.5 ± 0.7	8.2 ± 0.4
4	Estéril	1.0 ± 0.3	2.8 ± 1.1	6.3 ± 0.9	8.7 ± 0.5	10.1 ± 0.6
	Crudo	0.9 ± 0.4	3.6 ± 0.4	5.3 ± 0.5	7.1 ± 0.5	9.3 ± 0.7
5	Estéril	1.0 ± 0.8	3.6 ± 1.2	6.6 ± 0.7	8.2 ± 0.8	10.4 ± 1.8
	Crudo	1.6 ± 0.3	5.1 ± 0.7	7.3 ± 1.1	9.8 ± 1.4	12.6 ± 0.6

Tabla 30. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación sometidos a pasteurización de Alta Temperatura (80° C/6 h) (lote 1).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
2	Estéril	0.7 ± 0.1	2.8 ± 0.5	5.6 ± 0.2	6.9 ± 0.3	8.5 ± 0.5
	Crudo	2.6 ± 0.2	5.1 ± 0.8	7.8 ± 0.7	10.3 ± 0.8	12.6 ± 0.8
3	Estéril	2.4 ± 0.4	4.9 ± 0.2	6.4 ± 1.0	8.0 ± 0.5	13.0 ± 0.0
	Crudo	2.1 ± 0.2	5.2 ± 1.0	8.7 ± 0.6	12.0 ± 1.0	13.0 ± 0.0
4	Estéril	2.3 ± 0.2	5.2 ± 0.2	8.3 ± 0.2	12.8 ± 0.4	13.0 ± 0.0
	Crudo	2.9 ± 0.5	6.1 ± 0.2	9.2 ± 0.2	12.6 ± 0.5	13.0 ± 0.0
5	Estéril	0.3 ± 0.2	1.1 ± 0.9	3.0 ± 1.8	5.4 ± 2.7	6.9 ± 3.4
	Crudo	0.9 ± 0.3	3.7 ± 0.2	5.7 ± 0.6	7.4 ± 0.5	9.1 ± 0.5

Tabla 31. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación, sometidos a pasteurización de Baja Temperatura (60° C/10 h) y posterior acondicionamiento a 50° C/48 h (lote 2).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
2	Estéril	1.3 ± 0.2	4.4 ± 0.6	6.5 ± 0.5	8.3 ± 0.4	10.8 ± 0.2
	Crudo	0.9 ± 0.4	3.2 ± 0.9	6.5 ± 0.6	8.9 ± 0.4	10.5 ± 0.3
3	Estéril	1.1 ± 0.2	3.2 ± 0.3	5.5 ± 0.9	7.2 ± 0.5	10.3 ± 0.5
	Crudo	1.2 ± 0.1	3.7 ± 0.3	7.2 ± 0.2	8.9 ± 0.1	10.2 ± 0.2
4	Estéril	1.4 ± 0.3	4.1 ± 0.9	6.2 ± 0.9	8.1 ± 0.4	11.0 ± 1.2
	Crudo	1.0 ± 0.3	3.6 ± 0.6	6.4 ± 0.5	8.6 ± 0.6	10.4 ± 0.2
5	Estéril	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.2	6.2 ± 0.3	7.9 ± 0.4	10.1 ± 0.5
	Crudo	0.9 ± 0.3	2.6 ± 0.3	4.3 ± 0.3	6.1 ± 0.0	7.3 ± 0.3

Tabla 32. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación sometidos a pasteurización de Alta Temperatura (80° C/6 h) (lote 2).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
2	Estéril	0.7 ± 0.3	3.4 ± 0.6	5.1 ± 0.7	6.8 ± 0.9	9.1 ± 0.9
	Crudo	1.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2	5.5 ± 0.4	8.2 ± 0.7	10.4 ± 0.5
3	Estéril	0.9 ± 0.6	3.7 ± 0.6	5.8 ± 0.5	7.6 ± 0.6	9.8 ± 1.0
	Crudo	1.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2	6.2 ± 0.8	8.1 ± 0.4	9.8 ± 0.9
4	Estéril	1.3 ± 0.5	4.0 ± 0.3	6.0 ± 0.4	8.2 ± 0.7	9.9 ± 0.5
	Crudo	0.9 ± 0.2	2.9 ± 0.5	5.3 ± 0.6	7.2 ± 1.0	9.5 ± 0.4
5	Estéril	1.4 ± 0.3	4.3 ± 0.4	6.8 ± 0.3	8.2 ± 0.4	10.6 ± 0.7
	Crudo	1.0 ± 0.2	3.4 ± 0.5	6.3 ± 0.7	8.1 ± 0.7	9.6 ± 0.8

Tabla 33. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación, sometidos a pasteurización de Baja Temperatura (60° C/10 h) y posterior- acondicionamiento a 50° C/48 h (lote 3).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
		2	Estéril	1.3 ± 0.1	2.7 ± 0.4	5.3 ± 0.3
	Crudo	1.8 ± 0.2	3.6 ± 0.4	5.8 ± 0.5	7.5 ± 0.5	9.1 ± 0.3
3	Estéril	1.8 ± 0.4	3.1 ± 0.4	5.9 ± 1.2	8.0 ± 1.0	10.2 ± 0.6
	Crudo	1.2 ± 0.2	2.8 ± 0.4	5.8 ± 0.6	7.4 ± 0.6	9.3 ± 0.1
4	Estéril	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	7.3 ± 0.6	9.3 ± 0.4
	Crudo	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.9	5.2 ± 0.4	7.4 ± 0.2	10.0 ± 0.3
5	Estéril	0.9 ± 0.2	3.2 ± 0.5	5.7 ± 0.7	8.0 ± 0.5	10.0 ± 0.4
	Crudo	0.9 ± 0.2	3.6 ± 0.6	5.7 ± 1.0	7.7 ± 1.0	9.6 ± 1.0

Tabla 34. Invasión micelial (cm) de *P. ostreatus* (cepa HM) en sustratos crudos o estériles a diferentes períodos de fermentación sometidos a pasteurización de Alta Temperatura (80° C/6 h) (lote 3).

Período de fermentación del sustrato (días)	Condición del sustrato	Tiempo de incubación (días)				
		3	6	9	12	15
		2	Estéril	1.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3	4.7 ± 0.4
	Crudo	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	7.3 ± 0.5	9.3 ± 0.4
3	Estéril	1.1 ± 0.3	3.1 ± 0.4	4.6 ± 0.4	7.4 ± 0.3	9.2 ± 0.2
	Crudo	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	7.3 ± 0.5	9.3 ± 0.4
4	Estéril	1.4 ± 0.3	3.4 ± 0.4	4.8 ± 0.5	7.0 ± 0.2	8.7 ± 0.1
	Crudo	1.6 ± 0.4	3.0 ± 0.5	5.3 ± 0.5	7.4 ± 0.3	9.5 ± 0.3
5	Estéril	2.3 ± 0.8	4.4 ± 1.2	7.4 ± 1.9	11.6 ± 1.9	13.0 ± 0.0
	Crudo	1.8 ± 0.4	3.3 ± 0.4	6.4 ± 0.9	8.4 ± 1.0	10.4 ± 0.7

Tabla 35. Producción acumulada de esporóforos (g de hongos frescos/ 100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus*, en sustratos fermentados por 2 y 5 días y pasteurizados a dos temperaturas (AT = 80° C/6 h y BT = 60° C/10 h + 50° C/48 h), lote 1.

Período de fermentación (días)	Brote	Condiciones de pasteurización y acondicionamiento	
		AT	BT + 48 h
2	1	25.5 ± 13.2	48.8 ± 7.8
	2	40.2 ± 12.4	67.0 ± 10.8
	3	*57.5 ± 8.8	73.3 ± 7.1
5	1	18.1 ± 5.0	**31.6 ± 14.9
	2	30.4 ± 2.9	50.5 ± 8.4
	3	54.2 ± 7.6	53.4 ± 7.9

* 10% de contaminación

** 20% de contaminación

Tabla 36. Producción acumulada de esporóforos (g de hongos frescos/ 100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus*, en sustratos fermentados por 2 y 5 días y pasteurizados a dos temperaturas (AT = 80° C/6 h y BT = 60° C/10 h + 50° C/48 h), lote 2.

Período de fermentación (días)	Brote	Condiciones de pasteurización y acondicionamiento	
		AT	BT + 48 h
2	1	14.3 ± 5.5	28.6 ± 5.2
	2	26.3 ± 9.3	46.9 ± 6.6
	3	32.1 ± 11.7	59.6 ± 9.4
5	1	12.6 ± 5.4	23.4 ± 15.3
	2	31.6 ± 13.4	39.7 ± 12.8
	3	38.9 ± 10.5	*55.9 ± 15.3

* 10% de contaminación

Tabla 37. Producción acumulada de esporóforos (g de hongos frescos/ 100 g de sustrato seco) de *P. ostreatus*, en sustratos fermentados por 2 y 5 días y pasteurizados a dos temperaturas (AT = 80° C/6 h y BT = 60° C/10 h + 50° C/48 h), lote 3.

Período de fermentación (días)	Brote	Condiciones de pasteurización y acondicionamiento	
		AT	BT + 48 h
2	1	18.1 ± 13.7	24.5 ± 4.5
	2	28.9 ± 16.3	39.8 ± 6.1
	3	*33.8 ± 16.2	57.6 ± 5.6
5	1	22.5 ± 8.3	26.2 ± 10.6
	2	33.8 ± 7.1	40.7 ± 11.7
	3	*54.1 ± 17.0	52.8 ± 15.2

10% de contaminación

Tabla 38. Análisis de varianza para el desarrollo micelial obtenido en el lote 1 al considerar un diseño de tipo factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Temperatura de pasteurización (TP)	297.4	1	297.4	6.5	3.99 7.05	*
Período de fermentación (PF)	7917.6	3	2639.2	5.74	2.75 4.10	**
Condición del sustrato (CS)	1713.6	1	1713.6	3.73	3.99 7.05	NS
Interacciones						
(TP) * (PF)	22045.9	3	7348.6	15.98	2.75 4.10	**
(TP) * (CS)	2567.9	1	2567.9	5.58	3.99 7.05	*
(PF) * (CS)	3065.5	3	1021.8	2.22	2.75 4.10	NS
(TP) * (PF) * (SC)	3425.3	3	1141.8	2.48	2.75 4.10	NS
Error	2943.6	64	46.0			

(*) Diferencias significativas

(**) Diferencias altamente significativas

(NS) No hay diferencia significativa

Tabla 39. Desarrollo micelial en el lote 1 al ser sometidos a diferentes temperaturas de pasteurización, tiempos de fermentación y tratamientos térmicos.

Temperatura de pasteurización	Tiempo de fermentación (días)	Tratamiento térmico	$\bar{x} \pm \sigma$
Baja	3	Crudo	64.50 ± 6.6
Alta	5	Estéril	64.50 ± 5.2
Alta	2	Estéril	68.25 ± 2.1
Baja	4	Crudo	71.30 ± 5.2
Alta	5	Crudo	73.50 ± 5.2
Alta	3	Estéril	80.10 ± 5.4
Baja	5	Estéril	82.70 ± 8.2
Baja	4	Estéril	86.50 ± 4.8
Baja	3	Estéril	89.70 ± 4.5
Baja	5	Crudo	98.45 ± 13.7
Alta	2	Crudo	103.95 ± 7.7
Baja	2	Estéril	111.95 ± 7.0
Alta	3	Crudo	119.70 ± 10.0
Alta	4	Crudo	126.15 ± 5.3
Alta	4	Estéril	128.10 ± 4.2
Baja	2	Crudo	128.30 ± 3.8

$\bar{x} \pm \sigma$ = media ± desviación estándar

Tabla 40. Desarrollo micelial en los lotes 2 y 3 al ser sometidos a dos temperaturas de pasteurización (alta y baja) y tiempos de fermentación (2 a 5 días).

Temperatura de pasteurización	Tiempo de fermentación (días)	$\bar{x} \pm \sigma$
Baja	2	74.5 ± 6.1
Alta	2	76.7 ± 6.3
Baja	3	76.8 ± 10.1
Baja	4	77.2 ± 11.9
Alta	3	79.0 ± 4.8
Alta	4	79.3 ± 8.1
Baja	5	81.7 ± 9.2
Alta	5	83.8 ± 7.4

$\bar{x} \pm \sigma$ = media ± desviación estándar

Tabla 41. Desarrollo micelial en los lotes 2 y 3 al ser sometidos a diferentes tiempos de fermentación y tratamientos térmicos.

Tiempo de fermentación (días)	Tratamiento térmico	$\bar{x} \pm \sigma$
2	Estéril	76.4 \pm 9.3
2	Crudo	74.8 \pm 8.4
3	Estéril	78.7 \pm 10.4
3	Crudo	77.1 \pm 6.4
4	Estéril	79.0 \pm 9.2
4	Crudo	77.4 \pm 7.3
5	Estéril	83.6 \pm 9.8
5	Crudo	82.0 \pm 11.1

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 42. Análisis de varianza para el desarrollo micelial obtenido en los lotes 2 y 3 al considerar un diseño de tipo factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F Calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Temperatura de pasteurización (TP)	184.4	1	184.4	2.2	3.91 6.81	NS
Período de fermentación (PF)	1081.4	3	360.5	4.3	2.67 3.92	**
Condición del sustrato (CS)	103.6	1	103.6	1.2	3.91 6.81	NS
Interacciones						
(TP) x (PF)	3022.6	3	1007.5	12.0	2.67 3.92	**
(TP) x (CS)	260.7	1	260.7	3.1	3.91 6.81	NS
(PF) x (CS)	2649.4	3	883.1	10.5	2.67 3.92	**
(TP) x (PF) x (CS)	342.1	3	114.0	1.4	2.67 3.92	NS
Error	12059.7	144	83.8			

(**) Diferencias altamente significativas

(NS) No hay diferencia significativa

Tabla 43. Determinación de azúcares reductores en el lote 1 al ser sometidos a diferentes tiempos de fermentación y temperaturas de pasteurización.

Período de fermentación (días)	Temperatura de pasteurización	$\bar{x} \pm \sigma$
2	Baja	668.7 \pm 52.1
	Alta	1520.2 \pm 184.0
3	Baja	1171.3 \pm 62.0
	Alta	992.3 \pm 62.5
4	Baja	650.5 \pm 30.2
	Alta	817.9 \pm 68.2
5	Baja	1257.0 \pm 55.1
	Alta	718.4 \pm 57.7

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 44. Análisis de varianza para los azúcares reductores obtenido en el lote 1 al considerar un diseño de tipo factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F Calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Período de fermentación (PF)	1173556.5	3	391185.5	9.6	2.80 4.22	**
Temperatura de pasteurización (TP)	79467.9	1	79467.9	1.9	4.04 7.19	NS
(PF)* (TP)	3683728.5	3	1227909.5	30.1	2.80 4.22	**
Error	1956491.7	48	40760.2			

(**) Diferencias altamente significativas

(NS) No hay diferencia significativa

Tabla 45. Determinación de azúcares reductores en el lote 2 al ser sometidos a diferentes tiempos de fermentación y temperaturas de pasteurización.

Tiempo de fermentación (días)	Temperatura de pasteurización	$\bar{x} \pm \sigma$
5	Alta	807.4 \pm 46.5
2	Baja	907.3 \pm 87.4
3	Baja	965.6 \pm 56.6
5	Baja	1021.5 \pm 18.9
4	Baja	1052.2 \pm 47.3
4	Alta	1193.2 \pm 83.2
3	Alta	1280.0 \pm 169.2
2	Alta	1895.0 \pm 76.0

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 46. Análisis de varianza para los azúcares reductores obtenido en el lote 2 al considerar un diseño de tipo factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F Calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Período de fermentación (PF)	1675282.7	3	558427.6	78.5	2.80 4.22	**
Temperatura de pasteurización (TP)	1321642.0	1	1321642.0	185.7	4.04 7.19	**
(PF)* (TP)	2668452.3	3	889484.1	125	2.80 4.22	**
Error	341572.7	48	7116.1			

(**) Diferencias altamente significativas

Tabla 47. Determinación de azúcares reductores en el lote 3 al ser sometidos a diferentes tiempos de fermentación y temperaturas de pasteurización.

TIEMPO DE FERMENTACIÓN (días)	TEMPERATURA DE PASTEURIZACIÓN	$\bar{x} \pm \sigma$
5	Alta	764.1 \pm 80.1
2	Baja	896.4 \pm 76.3
4	Alta	998.4 \pm 64.0
4	Baja	1026.1 \pm 87.7
3	Baja	1088.2 \pm 63.9
3	Alta	1118.5 \pm 78.0
5	Baja	1131.5 \pm 100.5
2	Alta	1380.3 \pm 56.6

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 48. Análisis de varianza para los azúcares reductores obtenido en el lote 3 al considerar un diseño de tipo factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F Calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Período de fermentación (PF)	315375.6	3	105125.2	17.7	2.80 4.22	**
Temperatura de pasteurización (TP)	12390.6	1	12390.6	21	4.04 7.19	**
(PF)* (TP)	1285182.7	3	428394.2	72.1	2.80 4.22	**
Error	284910.2	48	5935.6			

(**) Diferencias altamente significativas

Tabla 49. Determinación de azúcares reductores en sustratos pasteurizados a alta temperatura.

Período de fermentación (días)	$\bar{x} \pm \sigma$
2	1596.33 \pm 266.48
3	1130.00 \pm 144.37
4	1002.67 \pm 188.04
5	761.33 \pm 47.06

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 50. Análisis de varianza para los valores de azúcares reductores obtenidos con sustratos tratados con diferentes tiempos de fermentación y pasteurizados a alta temperatura.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Tiempo de fermentación	1108126.9	3	369375.6	11.4	4.07 7.59	**
Error	258858.0	8	32357.3			

(**) Diferencia altamente significativa

Tabla 51. Clasificación de los tiempos de fermentación al considerar los azúcares reductores de acuerdo a la Prueba de rango múltiple de Duncan en sustratos pasteurizados a alta temperatura.

Período de fermentación	Subconjunto para alfa = .05		
	1	2	3
5 ^a	761.33		
4 ^{ab}	1002.67	1002.67	
3 ^b		1130.00	
2 ^c			1596.33

Letras diferentes en la columna del período de fermentación indican diferencias significativas

Tabla 52. Determinación de azúcares reductores en sustratos pasteurizados a baja temperatura.

Período de fermentación (días)	$\bar{x} \pm \sigma$
2	1466.33 \pm 170.72
3	1332.67 \pm 31.37
4	1178.67 \pm 271.31
5	954.33 \pm 144.29

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 53. Análisis de varianza para los valores de azúcares reductores obtenidos con sustratos sometidos a diferentes tiempos de fermentación y pasteurizados a baja temperatura.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Tiempo de fermentación	434955.333	3	144985.111	4.65	4.07 7.59	*
Temperatura de pasteurización	249114.667	8	31139.333			
Error	684070.000	11				

(*) Diferencias significativas

Tabla 54. Clasificación de los tiempos de fermentación al considerar los azúcares reductores de acuerdo a la Prueba de rango múltiple de Duncan en sustratos pasteurizados a baja temperatura.

Período de fermentación	Subconjunto para alfa = .05	
	1	2
5 ^a	954.33	
4 ^{ab}	1178.67	1178.67
3 ^b		1332.67
2 ^b		1466.33
Sig.	.158	.092

Letras diferentes en la columna del período de fermentación indican diferencias significativas

Tabla 55. Análisis estadístico descriptivo de Promedios azúcares reductores en sustratos pasteurizados a BT 24 h.

Período de fermentación (días)	$\bar{x} \pm \sigma$
2	1139.00 \pm 245.50
3	1175.00 \pm 309.96
4	937.33 \pm 79.43
5	1186.33 \pm 73.51

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 56. Análisis estadístico de anova Promedios azúcares reductores en sustratos pasteurizados a BT 24 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Entre grupos	122115.583	3	40705.194	.969	4.07 7.59	NS
Error	336113.333	8	42014.167			

(NS) No hay diferencia significativa

Tabla 57. Análisis estadístico de anova Promedios azúcares reductores en sustratos pasteurizados a BT 48 h

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Entre grupos	94574.667	3	31524.889	1.434	4.07 7.59	NS
Dentro de grupos	175894.000	8	21986.750			
Total	270468.667	11				

(NS) No hay diferencia significativa

Tabla 58. Análisis estadístico descriptivo de promedios de producción de esporóforos en sustratos pasteurizados a AT y BT (lotes 1, 2, 3).

Período de fermentación (días)	$\bar{x} \pm \sigma$
2	41.1 \pm 14.1
3	49.0 \pm 8.8
4	63.5 \pm 8.5
5	54.0 \pm 1.6

$\bar{x} \pm \sigma$ = media \pm desviación estándar

Tabla 59. Análisis estadístico de anova promedios de producción de esporóforos en sustratos pasteurizados a AT y BT (lotes 1, 2, 3).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculada	F Tablas ($\alpha=0.05$ y 0.01)	Interpretación
Entre grupos	789.167	3	263.056	2.96	4.07 7.59	NS
Dentro de grupos	709.760	8	88.720			

(NS) No hay diferencia significativa