



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA ESPUMA DE POLIURETANO EN LA
PRODUCCIÓN DE CUERPOS FRUCTÍFEROS DE
LENTINULA EDODES (SHIITAKE) Y SU
DEGRADACIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO
MICELIAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

FERNANDO FÉLIX URBINA



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Hermilo Leal Lara
Vocal	Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario	José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
1 ^{er} suplente	Oscar Hernández Meléndez
2 ^o suplente	Iliana Elvira González Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E",
Laboratorio 324, UNAM

Asesor del tema

Supervisor técnico

Hermilo Leal Lara

Rebeca Ramírez Carillo

Sustentante

Fernando Félix Urbina

Investigación realizada gracias al apoyo otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, al Proyecto DGAPA-PAPIIT IN 217114, cuya responsable es la Dra. Herminia Loza Tavera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme dado todas las herramientas para poder concluir mis estudios, por permitirme conocer a las personas indicadas a lo largo de la carrera (profesores, amigos y compañeros) y por darme una familia que siempre me ha apoyado en las diferentes etapas de mi vida.

Agradezco a la Dra. Rebeca por toda la asesoría y ayuda brindada a lo largo de esta investigación, al Dr. Hermilo por permitirme trabajar en este proyecto así como por el espacio brindado, a la Dra. Herminia por su asesoría y apoyo técnico y al Dr. Guillermo por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Agradezco a mi Familia, en especial a mis padres por estar siempre a mi lado, dándome todo su apoyo y por sentirse orgullosos de mí. A mi novia por brindarme su compañía todo el tiempo que duro este proyecto y seguirlo haciendo hasta hoy y a mis amigos por hacer más amenos los ratos de trabajo y estudio.

CONTENIDO

RESUMEN	6
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Antecedentes	8
1.1.1 <i>Lentinula edodes</i>	8
1.1.1.1 Generalidades	8
1.1.1.2 Composición	8
1.1.1.3 Taxonomía y ciclo de vida	9
1.1.1.4 Requerimientos nutricionales	11
1.1.1.5 Cultivo	12
1.1.2 Poliuretano	14
1.1.2.1 Generalidades	14
1.1.2.2 Problemática ambiental	15
1.1.2.3 Biodegradación de PU	15
1.1.3 <i>L. edodes</i> y biorremediación	16
1.2 Justificación	18
1.3 Objetivos	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos particulares	19
2 HIPÓTESIS	20
3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Material biológico	21
3.2 ePE-PU	21
3.3 Preparación de medios	22
3.3.1 Medio agar extracto de malta	22
3.3.2 Medio extracto de malta	22
3.3.3 Medio papa dextrosa	23
3.4 Resiembra de cepas	23
3.5 Evaluación de la pérdida de peso de ePE-PU en medio líquido por el crecimiento de cepas de <i>L. edodes</i> .	24
3.5.1 Preparación de ePE-PU	24

3.5.2	Preparación de matraces y esterilización	24
3.5.3	Inoculación e incubación	25
3.5.4	Lavado y pesado final de las espumas	26
3.6	Evaluación de la producción de hongos en sustratos adicionados con ePE-PU	27
3.6.1	Preparación del inóculo de grano	27
3.6.2	Determinación de humedad y máxima capacidad de hidratación de los componentes del sustrato	28
3.6.3	Preparación, esterilización e inoculación de sustratos	29
3.6.4	Inducción de la fructificación y cosecha	31
3.6.5	Resultados de producción	32
3.6.6	Tratamiento estadístico de los datos	33
4	EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	34
4.1	Recuperación de cepas de <i>L. edodes</i>	34
4.2	Evaluación de la capacidad de degradación de ePE-PU por el desarrollo micelial de <i>L. edodes</i>	35
4.3	Producción de esporóforos de <i>L. edodes</i> en sustratos con ePE-PU	39
4.3.1	Producción de esporóforos de cepa L5 de <i>L. edodes</i> en sustratos con ePE-PU.	39
4.3.2	Producción de esporóforos de cepa L9 de <i>L. edodes</i> en sustratos con ePE-PU.	44
4.3.3	Producción de esporóforos de cepa L15 de <i>L. edodes</i> en sustratos con ePE-PU.	49
4.3.4	Comparación entre las eficiencias globales de las cepas L5, L9 y L15 de <i>L. edodes</i> en sustratos con ePE-PU.	54
5	DISCUSIÓN	59
6	CONCLUSIONES	66
7	RECOMENDACIONES	68
8	BIBLIOGRAFÍA	69
	ANEXOS 1 y 2	73

RESUMEN

Lentinula edodes es uno de los hongos comestibles más explotados, el segundo a nivel mundial, aunque es poco explotado en México y Latinoamérica. Es altamente apreciado por ser uno de los hongos comestibles con mayores propiedades nutricionales y nutraceuticas, así como culinarias. *L. edodes* posee un importante sistema lignocelulósico que le permite desarrollarse en sustratos relativamente simples, de naturaleza lignocelulósica. Recientemente, a estos sistemas se le han encontrado aplicaciones relacionadas con la biorremediación.

Los poliuretanos comprenden a una serie de polímeros producidos por el hombre, con diversos usos debido principalmente a que son resistentes a agua, aceites y solventes. El primer poliuretano fue sintetizado por Otto Bayer en 1937 y debido a su gran resistencia representa hoy en día un importante problema para el medio ambiente. A pesar de su resistencia, el poliuretano puede ser degradado por las enzimas producidas por algunos microorganismos, principalmente hongos y bacterias.

La capacidad de degradación de espuma de poliéter poliuretano (ePE-PU) por diferentes cepas de *L. edodes* fue evaluada de forma indirecta, determinando la pérdida de peso de trozos de ePE-PU después de 30 días de incubación con el micelio de 5 diferentes cepas de *L. edodes* (L5, L9, L10, L15 y L21) en un medio líquido con bajas concentraciones de nutrientes. Las cepas L9, L15 y L21 cultivadas en el medio PD al 50%, produjeron la mayor pérdida de peso en las espumas, 14.2, 13.6 y 12.9%, valores superiores a los obtenidos con las cepas L5 y L10 (9.2 y 9.7%). Al disminuir la concentración de nutrientes en el medio PD al 25%, disminuyó la pérdida de peso, entre 6.2 y 7.8%. El mismo efecto se observó al usar el medio con extracto de malta a 1, 4 y 8 g/L; todas las cepas de *L. edodes* se desarrollaron sobre la espuma y produjeron pérdidas de peso de éstas, de 2 a 4% en el medio con 1 g/L mientras que en el medio con 8 g/L de extracto de malta la pérdida de peso fue de 5 a 8%.

Para evaluar si el uso de ePE-PU podría sostener el crecimiento y fructificación de *L. edodes*, parte del sustrato usado normalmente para la producción de cuerpos fructíferos (aserrín de encino blanco, cascarilla de algodón, mijo, sorgo, sulfato de amonio, ácido cítrico y sulfato de calcio) fue sustituido con ePE-PU (5 y 10% en

peso), evaluando el efecto sobre la eficiencia biológica (g de hongos fresco / 100 g de sustrato seco). Se evaluaron tres cepas (L5, L9 y L15) con ocho réplicas por cepa y por nivel de sustitución.

La cepa de L15 de *L. edodes* produjo una eficiencia biológica significativamente mayor en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU que su control, (54%) y no se observaron diferencias entre los sustratos con 5% de ePE-PU respecto a sus controles con las cepas L5 (64%) y L9 (59%). Las cepas L5 y L9 mostraron mayores eficiencias biológicas en los sustratos con 5% que en los sustratos con 10% de ePE-PU, (63 y 64% contra 50 y 55%), mientras que con la cepa L15 no se observó diferencia en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU (57 y 58%).

También se evaluaron otras características fenotípicas como el peso promedio y la proporción de estípites de los cuerpos fructíferos. El mayor factor de influencia sobre el peso promedio es la cepa misma, lo cual también determinó la respuesta a la presencia de ePE-PU en el sustrato. La cepa L5 produjo hongos más grandes en el sustrato con 5% de ePE-PU, 18 g, pero más pequeños en el sustrato con 10% de ePE-PU, 11 g. La cepa L9 produjo los hongos más pequeños, 9 g tanto en los sustratos con ePE-PU como en el sustrato control. Los hongos de la cepa L15 fueron en términos generales más pesados, 11, 16 y 23 g para el control y los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. La proporción de estípites fue entre 15 y 20% para las 3 cepas sin observarse un efecto claro debido a la presencia de ePE-PU en el sustrato.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Lentinula edodes*

1.1.1.1. Generalidades

Lentinula edodes mejor conocido como shiitake es un hongo conocido por los chinos como “Xiang-gu” que significa hongo fragante. Es un hongo comúnmente encontrado en la cocina tradicional de China, Japón y Corea y es el hongo favorito en oriente, no sólo por sus apreciado sabor y aroma sino también por sus alto valor nutritivo y porque contiene también compuestos medicinales bien identificados como lentinan, un polisacárido soluble con propiedades anticancerígenas (Chen, 2005). El hábitat natural del shiitake comprende a regiones del lejano oriente donde el clima es principalmente templado. Crece por grupos o clústeres en arboles de maderas duras como roble y otras especies de la región que se encuentren viejos o muertos (Stamets, 2000). Shiitake produce esporas y micelio blanco, presenta sombrillas hemisféricas que se aplanan y tornan de color café al madurar, sostenidas por un tallo o estípote fibroso (Cudris, 2011).

1.1.1.2. Composición.

Los cuerpos fructíferos de *L. edodes* recién cortados poseen 90% de humedad. Cuando son sometidos a un proceso de secado, como comúnmente se comercializan, 100 g de shiitake seco contienen 11.6 g de humedad, 17.3 g de proteína, 1.7 g de grasa, 4.8 g de cenizas y 64.6 g de carbohidratos, de los cuales, 6.7 g corresponden a fibra dietética (Kwon & Hodds, 2005). El shiitake es una excelente fuente de vitaminas como la tiamina (B1), riovoflavina (B2), niacina (B3) y vitamina D (ergosterol) y de minerales como potasio (K), fierro (Fe) y fosforo (P) (Kwon & Hobbs, 2005). La proteína contenida en el shiitake seco es comparable con la encontrada en la carne de pollo, res o cerdo, pero con niveles mucho más bajos de grasa y mayores contenidos de fibra. El shiitake contiene todos los aminoácidos esenciales, es abundante en lisina y arginina (Liu & Bau, 1980) y menos abundante en metionina y fenilalanina (Lasota & Sylwestrzak, 1989). Ha sido utilizado por años en la medicina tradicional asiática, actualmente la medicina moderna produce extractos de shiitake más concentrados y con mayor grado de pureza, los más utilizados son “lentinan”, un extracto de la pared celular obtenido del micelio o de los

cuerpos fructíferos y “LEM”, un extracto obtenido del micelio de *L. edodes* (Kwon & Hobbs, 2005).

Existe un gran número de publicaciones y estudios en los que se asocia a algún extracto o preparación de shiitake con efectos antitumorales (Chihara *et al.*, 1970), antivirales (Aoki, 1984) y antibacteriales (Know & Hobbs, 2005), así como hepato protectores y cardiovasculares (Yamamura & Cochran, 1974). El mecanismo general en los efectos antitumorales, antivirales y antibacteriales no es debido a que se ataque directamente a las células cancerosas, virus o bacteria, sino a la activación de diferentes respuestas inmunitarias en el hospedero (Aoki, 1984).

1.1.1.3. Taxonomía y ciclo de vida

Taxonómicamente el shiitake ha sido clasificado en varios géneros. Desde 1877, cuando Berkely lo propuso como *Agaricus edodes*, ha cambiado a los géneros *Collybia*, *Armillaria*, *Lepiota*, *Pleurotus* y *Lentinus*. En 1978, Pegler lo denominó *Lentinula edodes* por encontrar diferencias microscópicas con respecto a *Lentinus* (Stamets, 2000).

Según el diccionario de Ainsworth & Bisby's (2001) de hongos, *Lentinula edodes* se clasifica dentro del Reino Fungi, División *Eumycota*, subdivisión *Dikaryomycota*, Phylum *Basidiomycota*, Clase *Homobasidiomycetes*, Orden *Agaricales*, Familia *Tricholomataceae*, Género y Especie *Lentinula edodes*.

En la Figura 1.1 se observa el ciclo de vida de *L. edodes* el cual comienza con la generación de basidiosporas haploides uninucleadas producidas por meiosis, las cuales en un ambiente favorable germinan dando lugar a un micelio primario uninucleado haploide llamado homocarion. Durante la fase sexual dos cepas de basidiosporas compatibles se unen para formar el dicarion, del cual crece el micelio secundario (Chen, 2005). Es por la reproducción sexual que se forman las fibulas que son una huella del intercambio nuclear entre las células (Guzmán *et al.*, 2002).

A partir del micelio secundario y con un cambio en las condiciones se forma el micelio terciario o primordios. Éstos bajo condiciones óptimas dan origen a los cuerpos fructíferos. En su himenio se forman los basidios, en los que al madurar se

lleva a cabo la cariogamia o fusión nuclear definitiva entre los dos núcleos monocarióticos. El núcleo cigótico resultante sufre rápidamente una meiosis en la cual los genes de los tipos de compatibilidad y los que controlan otras funciones se segregan en cuatro núcleos hijos resultantes. El basidio tetra nucleado produce cuatro extensiones tubulares denominadas esterigmas, cuyos ápices se extienden formando las esporas. Estos hongos son haploides casi todo su ciclo de vida (crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos), únicamente las células que resultan de la cariogamia son diploides, dichas células se dividen inmediatamente formando cuatro células haploides o basidiosporas que son esparcidas por el viento y los insectos (Stamets & Chilton, 1983).

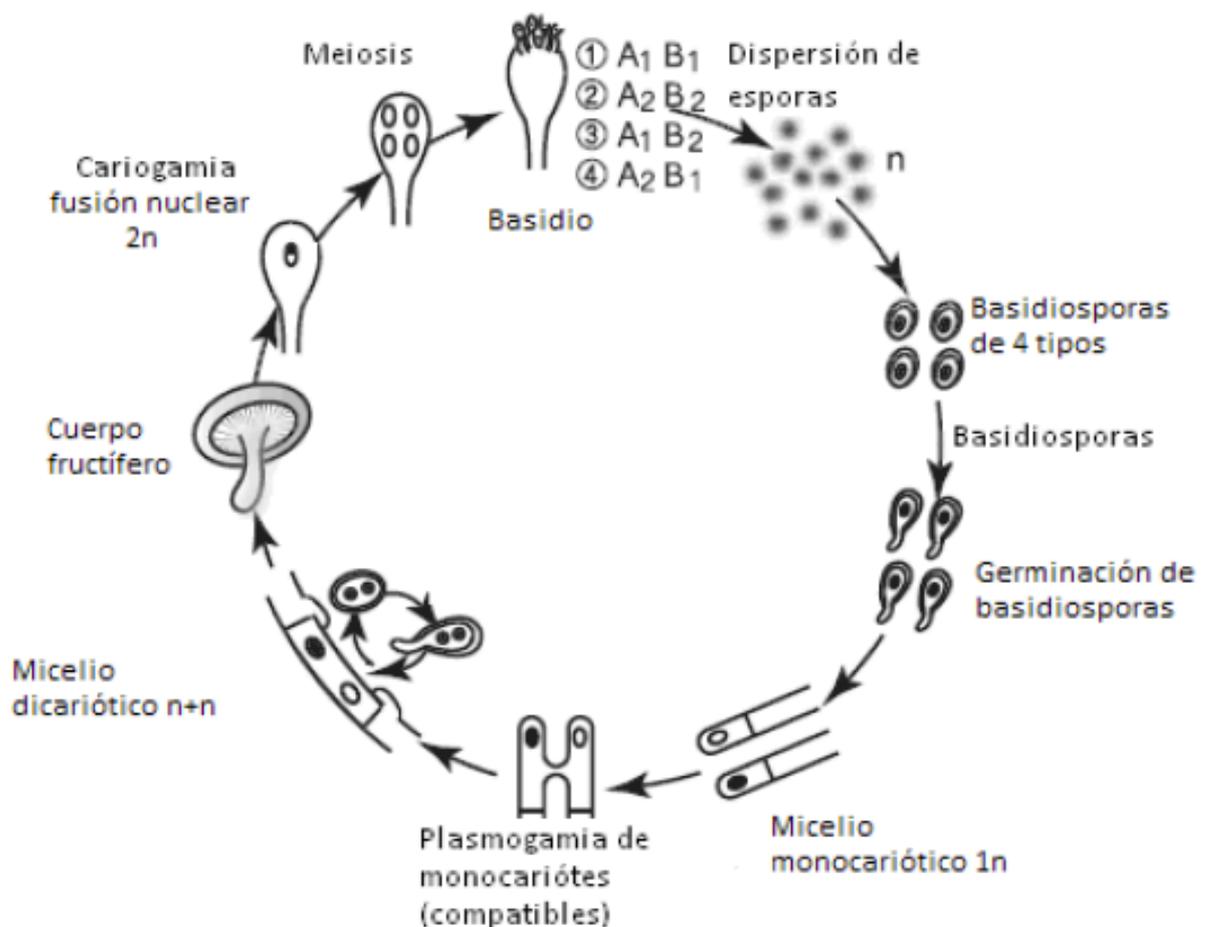


Figura 1.1 Ciclo de vida de *Lentinula edodes* (Chen, 2005)

1.1.1.4. Requerimientos nutricionales.

L. edodes es un organismo heterótrofo y por tanto necesita una fuente externa de carbono orgánico. Los compuestos vegetales constituyen el principal componente del sustrato para los hongos en la naturaleza por su contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Las enzimas extracelulares excretadas por las hifas degradan estos polisacáridos insolubles hasta unidades solubles, que son llevadas a las células y utilizadas en las diferentes vías metabólicas, con el fin de obtener energía y sintetizar las estructuras del hongo. El suministro de nitrógeno puede venir de sales como el ion amonio o de compuestos orgánicos como aminoácidos. Los compuestos nitrogenados son necesarios para la síntesis de proteínas, purinas, pirimidinas y quitina (Miles & Chang, 1997).

El crecimiento micelial y la producción de cuerpos fructíferos no sólo son afectados por factores nutricionales, sino también por factores ambientales. *L. edodes* crece dentro de un intervalo de pH de 3 a 6 con un óptimo entre 4.5 y 5.5 en la fase micelial y de 3.5 a 4.5 para la formación de primordios. La actividad enzimática está ampliamente relacionada con la temperatura, la cual se incrementa al aumentar la temperatura hasta un valor máximo donde las enzimas se desnaturalizan. La temperatura óptima para el crecimiento del micelio de *L. edodes* está entre 24 y 27°C y puede crecer entre 5 y 35°C. Puede fructificar entre 5 y 25°C con una temperatura óptima en 15°C (Chen, 2005).

Otros factores ambientales influyen directamente en el crecimiento de *L. edodes* como la humedad, iluminación y aireación. La humedad óptima varía dependiendo de la etapa, durante la fase micelial se maneja una humedad relativa en el ambiente de 50 a 75%, y de 80 a 95% durante la etapa de fructificación (Chang & Hayes, 1978). Debido a que *L. edodes* es fototrófico, la luz es un factor muy importante durante la fase de fructificación. El nivel óptimo de luz en esta etapa es de 50 a 100 lx. La aeración para el correcto desarrollo de *L. edodes* es también muy importante ya que es un organismo aerobio y durante su desarrollo requiere de diferentes concentraciones de oxígeno, siendo la fase de fructificación donde estos requerimientos son mayores. Una correcta aireación es necesaria durante la etapa de fructificación para dispersar las altas concentraciones de dióxido de carbono acumuladas durante el crecimiento micelial (Chen, 2005).

1.1.1.5. Cultivo

El shiitake se puede cultivar por dos métodos, el más antiguo y tradicional es en troncos de maderas duras y recientemente en sustratos sintéticos esterilizados.

En el cultivo tradicional el inóculo se deposita directamente en troncos de especies de árboles de maderas duras como el shii (*Castanopsis cuspidata*) de Japón o varias especies de encino en Estados Unidos. Los troncos se cortan del tamaño deseado y se hacen perforaciones a lo largo del tronco. Posteriormente se inocula con semillas invadidas por micelio fresco, las perforaciones llenas de semillas se sellan con cera o resina para prevenir la contaminación y la evaporación. El crecimiento micelial puede durar entre 6 y 18 meses dependiendo de la cepa, y del tamaño del tronco, entre otros. Cuando el micelio ya ha invadido todo el tronco se traslada al área de fructificación, la cual por lo general es en un área más fría y húmeda que el área de crecimiento micelial. Este cambio en el medio ambiente provee de las condiciones para la formación y desarrollo de cuerpos fructíferos. Las eficiencias biológicas reportadas para este tipo de cultivo son de 33%, con una vida útil para los troncos inoculados de 6 años, obteniendo los mayores rendimientos durante el segundo o tercer año (Royse, 2001).

Con objeto de reducir la duración del ciclo de cultivo y aumentar los rendimientos bajo condiciones controladas se ha sustituido el método tradicional en troncos por sustratos sintéticos estériles. Estos sustratos están compuestos por aserrín de maderas duras y algunos suplementos como salvado de trigo, arroz, avena, cebada, mijo y sorgo entre otros. Este método permite una producción continua pero con mayores gastos de inversión y consumo de energía (Ramírez y Leal, 2001-2003). Este método consiste en mezclar los componentes del sustrato e hidratarlos hasta una humedad de 65%, posteriormente empacarlos y compactarlos en bolsas tolerantes al calor, generalmente de polipropileno. A continuación los sustratos se esterilizan en autoclave a 121°C por una hora (Miles & Chang, 1997). Una vez frío el sustrato se inocula con la semilla de *L. edodes*, la cual proviene de granos de cereales inoculados con el hongo.

Las bolsas son cerradas y agitadas para dispersar la semilla y posteriormente se incuban dentro de un cuarto o cámara a 24°C en obscuridad. La superficie ya

colonizada empieza a pigmentarse de un color café oscuro y aparecen algunas aglomeraciones de micelio, que posteriormente darán origen a los primordios, en este momento el sustrato está listo para la fructificación. Dependiendo de la cantidad de inóculo utilizado y el tamaño de las bolsas con sustrato, la incubación puede demorar de 1 a 4 meses, transcurrido ese tiempo se inicia la etapa de fructificación. En esta etapa se retira la bolsa en la que estaba contenido el sustrato y se debe mantener una humedad relativa del ambiente de entre 80 y 90%. El número de cosechas depende principalmente del sustrato utilizado (Curiel Pérez, 2012).

A nivel mundial la producción de *L. edodes* se ha elevado de manera constante, en 1983 la producción fue de 207,700 toneladas y para 1997 se incrementó hasta 1,321,600 toneladas. China, Japón y Taiwán son los principales productores con un 98.5% de la producción mundial total (Chan & Miles, 2004). En América Latina el cultivo de hongos comestibles ha ido en aumento en los últimos años. En el período comprendido entre 1995 - 2001 hubo un aumento de la producción en 32% para la región de América Latina, es decir, de 49,975 a 65,951 toneladas de hongo fresco por año. Dentro de los países más destacados en la producción de hongos comestibles se encuentran: México con 58.6%, Chile con 17.6% y Brasil con 10.6%, que representan el 87% del total de la producción de hongos comestibles de América Latina, donde México es actualmente el principal productor y el vigesimotercero a nivel mundial (Martínez-Carrera, 2002). En lo que se refiere al cultivo de shiitake, en 2002 México fue el segundo productor de América Latina, con una producción de 30 toneladas, pero muy por debajo de Brasil, el primer lugar regional con 800 toneladas para el mismo año (Andrade *et al.*, 2012).

1.1.2. Poliuretano

1.1.2.1. Generalidades

Desde la primera síntesis de poliuretano realizada por el profesor Otto Bayer en el año de 1937 los poliuretanos (PU) han sido utilizados de distintas formas sobre todo en espumas rígidas y flexibles. El término poliuretano incluye todos aquellos polímeros que contienen un número significativo de grupos uretano, no necesariamente repetidos de forma regular. Estos polímeros se obtienen de la

reacción de poliisocianatos, con moléculas que contengan grupos OH reactivos como los polioles (Figura 1.2). Además de los grupos uretano, un PU típico puede contener grupos hidrocarbonados alifáticos o aromáticos, grupos éster, éter, amida y urea. Por ello los poliuretanos son polímeros muy versátiles, siendo utilizados en gran número de aplicaciones como espumas, elastómeros, recubrimientos, selladores, fibras, películas entre otros (Pérez, 2010).

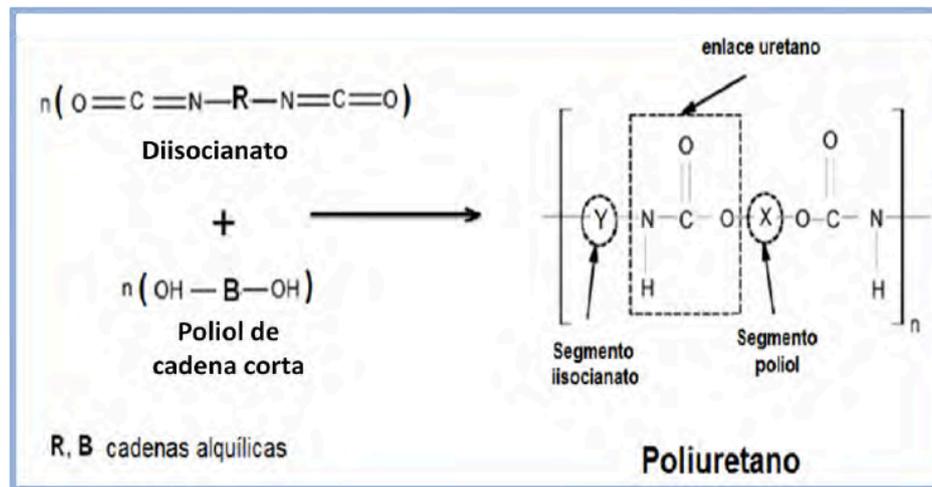


Figura 1.2. Reacción de formación del PU (Álvarez Barragán, 2013)

De acuerdo al poliol utilizado, los PUs se pueden dividir en dos grupos: poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU) (Urbanski *et al.*, 1997). Los usos del PU dependen de su composición estructural. En la industria aquellos que tiene grupos poliéter son los más empleados como aislantes térmicos, mientras que los que tiene grupos poliéster son utilizados principalmente como partes de automóviles (Howard, 2002).

Las espumas de PU poseen celdas abiertas y/o cerradas, son permeables al aire, reversibles a la deformación y pueden ser producidas con diversas propiedades como firmeza y resiliencia. Las espumas de PU ofrecen características que ningún otro material proporciona, tales como comodidad, durabilidad, bajo peso y bajo costo. La formación de la espuma depende de dos reacciones básicas: la reacción entre el isocianato con el poliol (gelación) para formar el enlace uretano y la reacción de isocianato con el agua (soplado) para formar los enlaces urea y el desprendimiento de CO₂, que permite la formación de la espuma (Winding, 1961).

1.1.2.2. Problemática ambiental

En diversos ramos de la industria las espumas de PU tienen diversos usos, por ejemplo: en la industria automotriz en asientos, rellenos de interiores para amortiguar vibración y ruido; en muebles como relleno de colchones almohadas y cojines; en la construcción las espumas rígidas pueden sustituir estructuras de ladrillo, cemento o madera; y como aislante térmico, aplicación también utilizada en refrigeradores (Woods, 2001). Es debido a sus múltiples usos y aplicaciones que el PU ocupa entre 6 y 7% de la producción mundial total de plásticos (Cangemi *et al.*, 2008) y en Estados Unidos de Norteamérica se generan alrededor de 1.3 millones de toneladas de PU al año (Alavi-Nikje *et al.*, 2011).

1.1.2.3. Biodegradación del PU

La biodegradación se refiere a cualquier proceso de recuperación del medio ambiente que permite destruir o transformar contaminantes en compuestos menos peligrosos, en este proceso pueden participar bacterias, hongos, plantas o enzimas generadas por éstos (Ren, 2003). El objetivo principal de la biodegradación es transformar contaminantes en metabolitos que puedan ser incluidos en las vías metabólicas de los microorganismos, los mineralicen y generen productos como H₂O, CH₄ y CO₂ (Seo *et al.*, 2009).

Los plásticos son compuestos relativamente nuevos para la naturaleza, por lo cual la mayoría de ellos son resistentes al ataque de los microorganismos, debido a que no ha transcurrido el tiempo suficiente para que evolutivamente se generen nuevas estructuras enzimáticas capaces de degradarlos (Shah *et al.*, 2008). Aunque la mayoría de los plásticos no son biodegradables, el poliuretano contiene esqueletos intermoleculares análogos a las macromoléculas que se encuentran en la naturaleza (con enlaces éster, éter y uretano) haciéndolos susceptibles a la degradación enzimática producida por microorganismos de la naturaleza (Kawai, 1995).

Algunos de los hongos filamentosos unicelulares que han sido encontrados y aislados de PUs en descomposición con la capacidad de degradarlo son: *Gliocladium roseum*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Gliocladium pannorum* y *Nectria gliocladioides* (Barrat *et al.*, 2003). En los materiales poliméricos, el ataque microbiano se puede dar de tres diferentes formas:

daño biofísico por efecto del crecimiento celular; efecto bioquímico en el cual el microorganismo produce sustancias que afectan la constitución del poliuretano y la acción directa de enzimas sobre la estructura molecular (Cangemi *et al.*, 2008).

El principal mecanismo de degradación de polímeros se da por oxidación o hidrólisis producida por enzimas, causando la ruptura de enlaces para generar productos de menor peso molecular que son más accesibles para la asimilación del microorganismo (Barrat *et al.*, 2003). En la biodegradación de PU se han encontrado involucradas actividades enzimáticas de esterases y proteasas, como responsables de la degradación y se han propuesto que lacasas y ureasas, podrían también estar involucradas (Loredo-Treviño *et al.*, 2011).

1.1.3. *L. edodes* y biorremediación

El término biorremediación o biorrecuperación se refiere a una variedad de sistemas de recuperación que degradan, transforman, eliminan o disminuyen la toxicidad de contaminantes orgánicos o inorgánicos a través de la actividad biológica natural de plantas, hongos o bacterias. Esta estrategia de recuperación depende de las actividades catabólicas de los organismos y, por tanto, de su capacidad para usar los contaminantes como fuente de carbono. El proceso de biorremediación incluye, además de biodegradación de contaminantes, reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de quelación que provocan la inmovilización de metales (Eweis *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 1992).

El sistema lignocelulósico de *L. edodes* se ha relacionado con la biorremediación ya que es un hongo saprófito, es decir que crece en materia muerta o en descomposición, de podredumbre blanca con capacidad para degradar sustratos altamente recalcitrantes difíciles de descomponer como celulosa, hemicelulosa y lignina. Las enzimas extracelulares excretadas por las hifas degradan estos polisacáridos insolubles hasta unidades solubles, que son llevadas a las células y utilizadas en las diferentes vías metabólicas (Chen, 2005). Los sistemas lignocelulolíticos de los hongos basidiomicetos están compuestos generalmente por enzimas como la lignina peroxidasa, lacasa y manganeso peroxidasa (Chia-Wei & Vikinewary, 2012). En *L. edodes* se han observado altas producciones de

manganeso peroxidasa y lacasa en experimentos de fermentación en estado sólido (Hatvani & Mécs, 2001), así como también la producción de esterases (Itävaara, 1988).

L. edodes ha sido utilizado en estudios de biorremediación demostrando capacidad para degradar diversos compuestos contaminantes como los colorantes sintéticos Poly R-478, azul brillante de remazol, rojo Congo, verde de metilo, violeta de metilo, y violeta de etilo, en los cuales se ha demostrado la actividad de las enzimas lignocelulolíticas (Gandofi *et al.*, 2004). *L. edodes* también ha sido utilizado para la quelación de metales pesados (Chen *et al.*, 2005). La degradación de colorantes ha sido un fenómeno ampliamente estudiado debido a que los colorantes sintéticos contienen unos a más anillos aromáticos, como muchos otros contaminantes sintéticos, pero son solubles en agua y su concentración y degradación son fáciles de medir espectrofotométricamente (Hatvani & Mécs, 2002).

1.2. Justificación

El acelerado desarrollo industrial que se ha vivido en los últimos años ha traído consigo la aparición de muchos materiales nuevos para la naturaleza. Estos materiales son utilizados y desechados rápidamente, generando grandes cantidades de desechos por lo cual es necesario desarrollar nuevas técnicas para su tratamiento. El PU y en específico las espumas de PU han sido ampliamente utilizadas en muebles, automóviles y refrigeradores, generando grandes cantidades de residuos que son difíciles de tratar.

En diversos estudios se ha demostrado que la espuma de PU puede ser atacada y degradada por hongos y bacterias que poseen enzimas que les permiten utilizar la espuma como fuente de carbono. Hasta hoy en día no se había probado la utilización de hongos basidiomicetos en la degradación de poliuretano.

Lentinula edodes es el segundo hongo más cultivado en el mundo, es altamente apreciado por sus propiedades culinarias y nutraceuticas. *L. edodes* crece generalmente en sustratos ricos en lignina y celulosa que son compuestos altamente recalcitrantes de estructuras semejantes a las de la espuma de PU. Por lo anterior se consideró que *L. edodes* al tener la capacidad de crecer en estos medios puede ser también utilizado para desarrollarse en medio con espuma de PU y en consecuencia degradar la espuma.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la utilización de la espuma de poliéter poliuretano como parte del sustrato de varias cepas de *Lentinula edodes* durante distintas fases de su crecimiento.

1.3.2. Objetivos particulares

- Evaluar la pérdida de peso de espuma de poliéter poliuretano durante la fase de crecimiento micelial con diferentes cepas de *Lentinula edodes* (L5, L9, L10, L15 y L21) en medio líquido.
- Comparar la eficiencia biológica (g de hongos fresco / 100 g de sustrato seco) producida por diferentes cepas de *Lentinula edodes* (L5, L9 y L15) al utilizar sustratos con distintas concentraciones de espuma de poliéter poliuretano (5 y 10%) respecto a un sustrato control sin espuma.

2. HIPÓTESIS

Dado que *Lentinula edodes* es un hongo saprófito con capacidad para degradar lignina, posiblemente tendrá también la capacidad para degradar la espuma de poliéter poliuretano y utilizarla como parte de su sustrato de desarrollo. El crecimiento del micelio provocará pérdidas de peso en las espumas durante la fase micelial al estar en espuma de poliéter poliuretano y en medios líquidos, y al usar sustratos lignocelulósicos de fructificación con distintas proporciones de espuma de poliéter poliuretano, no se verán afectados los rendimientos de los esporóforos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se utilizaron las siguientes cepas de *L. edodes*: L5, L6, L9, L10, L11, L15, L18, L21, L23, L24 y L25; obtenidas del cepario de hongos comestibles del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Estas cepas se encuentran conservadas en refrigeración mediante resiembras sucesivas en medios sólidos de agar extracto de malta.

Las cepas L5, L9 y L15 que se llevaron a fructificación son las cepas que han sido más utilizadas en diversos trabajos en el laboratorio por lo que se sabe que la cepa L5 se caracteriza por producir hongos más grandes, pero en menor cantidad obteniendo buenos rendimientos, mientras que la cepa L9 se caracteriza por producir un elevado número de hongos de menor tamaño pero igualmente presenta buenos rendimientos. La cepa L5 fue donada por el Dr. Ian Reid del “Consejo de Investigación Nacional de Canadá”. Las cepas L9 y L15 fueron donadas por el Dr. Tai-Soo Lee del “Instituto de Investigación Forestal de Corea”.

3.2. ePE-PU

En las dos etapas del experimento se utilizó la misma espuma de poliéter poliuretano (ePE-PU) donada por el Ing. Gabriel García Batarse, Gerente de Planta de Espumas Industriales Monterrey, SA de CV con las características indicadas en la Tabla 3.1 (Álvarez Barragán, 2013). Las características químicas de los componentes utilizados en la fabricación de la espuma son las siguientes:

- TDI: disocianato de tolueno, tiene una mezcla de isómeros 2, 4 y 2, 6 en proporción 80 y 20%, respectivamente.
- CARADOL SC56-22: óxido de etileno, óxido de poliál de poliéter a base de propileno.
- CARADOL MD30-45: óxido de etileno, óxido de poliéter-poliál adicionado con un copolímero de estireno-acrilonitrilo para aumentar la dureza.

Tabla 3.1. Características de la ePE-PU

Aspecto		
Densidad		15.5 kg/m ³
Composición	CARADOL MD30-45:	45 pph
	CARADOL SC56-22:	55 pph
	TDI	52.7 pph
	Agua	4.05 pph
	CH ₂ Cl ₂	7.7 pph
*pph = libras por hora en reactor al momento de su fabricación		

3.3. Preparación de medios

3.3.1. Medio agar extracto de malta

El medio de agar de extracto de malta (AEM) se preparó disolviendo 7.5 g de extracto de malta en 100 ml de agua destilada, a continuación se agregaron 9 g de agar bacteriológico, se agitó el matraz para dispersar el agar y se adicionaron 400 ml de agua destilada. El medio ya preparado se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in² de presión durante 45 minutos. Del medio estéril se vertieron 10 ml en cajas Petri estériles, con la ayuda de una jeringa de llenado continua. Una vez que el medio solidificó las cajas Petri se colocaron en bolsas de plástico y se dejaron incubando 24 horas a 24°C para verificar su esterilidad. Este medio se utilizó para las resiembras, purificación, y mantenimiento de todas las cepas.

3.3.2. Medio extracto de malta

Este medio se preparó pesando en balanza analítica 0.5, 2 y 4 g de extracto de malta en matraces volumétricos de 500 ml, se aforaron con agua destilada y el extracto de malta se disolvió con agitación. Estos medios se usaron para evaluar la degradación de espuma de ePE-PU en medio líquido y se usan inmediatamente después de su preparación.

3.3.3. Medio papa dextrosa

Para la preparación de este medio se pesaron 250 g de papa blanca con cáscara lavada, se rallaron usando un rayador de cocina convencional, se colocaron en un matraz de 2 L y se le agregó 1 L de agua destilada. El matraz con la papa y el agua se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in² durante 45 min. El contenido del matraz se filtró primero por gasa para separar los residuos sólidos grandes, y posteriormente se filtró nuevamente por papel Whatman #2 con vacío, con ayuda de un matraz Kitasato. El líquido obtenido se aforó a un litro con agua destilada y se disolvieron en esta solución 20 g de dextrosa. Para la preparación del medio al 50% de tomaron 500 ml del medio al 100% y se aforó a 1 L. Para preparar el medio al 25% se tomaron 250 ml del medio al 50% y se aforaron a 500 ml. Estos medios se utilizaron para evaluar la degradación de espuma de ePE-PU en medio líquido y se emplean inmediatamente después de su preparación.

3.4. Resiembra de cepas

A partir de cajas en refrigeración con medio de agar extracto de malta (AEM) con cultivos miceliales de cada una de las siguientes cepas de *Lentinula edodes*: L5, L6, L9, L10, L11, L15, L18, L21, L23, L24 y L25; se tomaron dos cajas para cada cepa y se resembraron en medio AEM cortando y tomando pequeños cuadros del agar con el crecimiento micelial en refrigeración y colocándolos en una caja con AEM limpio.

Las dos cajas resembradas de cada cepa se incubaron a 24°C por 72 horas. A continuación se observó si el crecimiento micelial obtenido en cada caja estaba libre de contaminantes (bacterias, levaduras o mohos). Cuando el micelio se veía libre de contaminantes se observó al microscopio (con un aumento de 16x) para confirmar su carácter dicariótico por medio de la presencia de fíbulas. Una vez confirmado que las cepas estaban libres de contaminación y presentan carácter dicariótico se procedió a resembrar 8 cajas de cada cepa en medio AEM, dejándose incubar a 24°C hasta la total invasión del medio de cultivo con el crecimiento micelial de cada cepa. Las cepas que presentaron algún tipo de contaminación fueron resembradas nuevamente para tratar de eliminar todo tipo de contaminación y obtenerlas como cepas puras. Las cepas que no presentaron fíbulas fueron descartadas y

resembradas nuevamente a partir de cajas diferentes, almacenadas en refrigeración.

3.5. Evaluación de la pérdida de peso de ePE-PU en medio líquido por el crecimiento de cepas de *L. edodes*

Para evaluar la degradación de ePE-PU en medio líquido se prepararon matraces de 250 ml con 15 ml del medio líquido y un cubo de ePE-PU por cada matraz. Los matraces con la espuma y el medio se esterilizaron y se inocularon de manera individual con una suspensión del micelio de la cepa de *L. edodes* seleccionada. Después de 30 días de incubación se retiró el micelio de la espuma manualmente y se eliminó cualquier resto lavando la espuma con una solución de hipoclorito de sodio para determinar la pérdida de peso de la espuma. Para cada cepa se realizaron cuatro replicas y cuatro controles sin inocular por cada experimento y se realizaron dos experimentos en los cuales se evaluaron 3 cepas en cada uno.

3.5.1. Preparación de ePE-PU

La primera etapa consistió en cortar pequeños pedazos de 2.5 cm de largo x 1 cm ancho x 0.5 cm de altura de ePE-PU con tijeras de buen filo para no dejar rebabas o bordes dispares. Para evitar que las espumas tuvieran polvo o algún otro contaminante se lavaron usando únicamente agua destilada, no se usaron detergentes, el lavado se hizo sumergiendo y exprimiendo las espumas en el agua destilada tres a cuatro veces en un recipiente, con aproximadamente 25 cubos en 500 ml de agua. Después del lavado las espumas se secaron hasta llevarse a peso constante en desecador a vacío a temperatura ambiente, esto tardó 48 horas, aproximadamente.

3.5.2. Preparación de matraces y esterilización

Para evaluar la pérdida de peso de ePE-PU en medio líquido se seleccionaron dos medios; extracto de malta (EM) y papa dextrosa (PD). El medio EM se utilizó a 3 concentraciones (1, 4 y 8 g/l) y el medio PD se utilizó a 2 concentraciones (diluciones al 25 y 50% del medio original). Se colocó en matraces de 250 ml un cubo de espuma previamente lavado y pesado y se adicionaron 15 ml del medio

diluido. La espuma debió estar parcialmente sumergida en el medio para que se impregnara de medio y no quedara flotando. El matraz se identificó para conocer en todo momento el medio y el peso de la espuma. Se taparon los matraces con una espuma de ePE-PU, una liga y aluminio con el objetivo de permitir el intercambio de gases (Figura 3.1). Los matraces con el medio y la ePE-PU se esterilizaron en autoclave por 30 min a 121°C y 15 lb/in², y posteriormente se dejaron enfriar en la campana de flujo laminar para su posterior inoculación.



Figura 3.1. Matraz con espuma de ePE-PU y medio líquido previo a su inoculación

3.5.3. Inoculación e incubación

Para preparar el inóculo se utilizó el micelio de la cepa de *L. edodes* desarrollado en una caja de agar extracto de malta después de 10 días de incubación a 24°C en 10 ml de agar extracto de malta. Esta colonia se homogeneizó con 50 ml de agua destilada estéril por 30 segundos en un homogeneizador de laboratorio estéril a la velocidad más alta. Cada matraz con la ePE-PU se inoculó con 200 µl del micelio homogeneizado, el inóculo se depositó sobre la espuma, todo esto en campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Los matraces inoculados y los controles se incubaron en obscuridad y con una temperatura constante de 24°C por 30 días. Cada tercer día se revisó el desarrollo del micelio y que estuviera libre

de contaminantes. El matraz fue desechado en caso de observarse turbidez en el medio líquido en los primeros días.

3.5.4. Lavado y pesado final de las espumas

Terminado el tiempo de incubación se retiró la mayor cantidad posible de micelio cortándolo con una navaja afilada, cuidando de no cortar la espuma, se drenó el medio y se lavó el matraz. En el mismo matraz lavado e identificado se colocó la espuma y se le adicionaron 50 ml de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial CLORALEX[®] (diluida al 30% v/v). Se presionó de dos a tres veces la espuma para sumergirla bien en la solución, esta operación se repitió a las 3 horas, se observó que el micelio se desprendió de la espuma causando turbidez en la solución. Transcurridas 24 horas se eliminó la solución de hipoclorito por decantación, se añadieron 40 ml de agua destilada y se agitó de manera manual durante 2 min, esta operación se repitió 5 veces. Una vez terminados los lavados se decantó el agua y se retiró el exceso mediante filtración a vacío con ayuda de un embudo Büchner, acoplado a un matraz Kitasato con un papel filtro sobre el que se colocó la espuma; la espuma se mantuvo durante un minuto de un lado y después de le dio la vuelta, y se mantuvo así durante un minuto más.

Una vez terminado el lavado, las espumas se colocaron en pequeños pedazos de aluminio identificado y se secaron a vacío a temperatura ambiente durante 48 horas hasta obtener peso constante. Las espumas secas se pesaron con precisión de 0.0001 g. Para calcular la pérdida de peso se utilizó la ecuación 1. Para calcular la pérdida de peso causada sólo por el crecimiento micelial de *L. edodes*, a la pérdida de peso total de la espuma se restó la pérdida de peso promedio de los controles del mismo medio y del mismo experimento.

Ecuación 1

Pérdida de peso en ePE – PU (%)

$$= \left(\frac{\text{peso espuma inicial} - \text{peso de espuma final}}{\text{peso espuma inicial}} \right) \times 100$$

3.6. Evaluación de la producción de hongos en sustratos adicionados con ePE-PU

Otra forma para evaluar una posible degradación de la ePE-PU fue mediante la evaluación la producción de esporóforos de *L. edodes* en sustratos en los cuales una parte del material orgánico en el sustrato fue sustituido por ePE-PU. Para esto se seleccionaron dos niveles de sustitución, 5 y 10%, y se compararon contra un control con 0% de ePE-PU, se usaron solo tres cepas L5, L9 y L15 con ocho réplicas por cada cepa y por cada nivel de ePE-PU, en sustratos con 1500 g aproximadamente. Cada cepa se manejó como un lote distinto por cuestiones de material y equipo.

3.6.1. Preparación del inóculo de grano

La primera etapa para la producción fue la preparación del inóculo de grano. Para ello se limpiaron y lavaron 2 kg de grano de trigo seco y se colocaron en agua a temperatura de ebullición durante 50 min aproximadamente (hasta que el grano estuviera suave, sin que llegara a reventarse). A continuación se enfriaron los granos al chorro de agua, se drenó el exceso de agua en un escurridor y se pesó. Con base en el peso húmedo se agregó CaSO₄ al 1.3% y CaCO₃ al 0.3%, se mezcló el grano con las sales y se colocaron 500 g en bolsas de polipapel de 15 x 25 cm. El grano ya empacado se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in² durante 120 min. Bajo estas condiciones se preparó un total de 3 kg de inóculo de grano para cada cepa. Después de la esterilización se dejaron enfriar las bolsas y se inocularon con una colonia de *L. edodes* desarrollada previamente en una caja con 10 ml de agar AEM (incubada a 24°C por 10 días). En condiciones asépticas, la colonia se cortó en cuadros de 1 cm² aproximadamente y se distribuyeron en una bolsa con 500 g de grano estéril. En la parte superior de las bolsas inoculadas se colocó un tubo desinfectado de PVC de 2 pulgadas y el área expuesta fue cubierta con un cuadro de espuma de poliuretano estéril para permitir la respiración del micelio durante el

período de incubación. La incubación se realizó a una temperatura de 24°C, en condiciones de oscuridad hasta que el grano fue totalmente invadido por el micelio, aproximadamente 4 semanas después (Figura 3.2).



Figura 3.2. Inóculo de grano de la cepa L9 después de 3 semanas de incubación

3.6.2. Determinación de humedad y máxima capacidad de hidratación de los componentes del sustrato

Para poder calcular la humedad real del sustrato se determinó la humedad y la máxima capacidad de hidratación de cada componente, ya que la formulación del sustrato se hizo en base húmeda. Para determinar la humedad se tomaron 4 muestras de cada componente, se pesaron y secaron en una estufa a 60°C por 48 horas, trascurrido el tiempo de secado se pesaron nuevamente, el porcentaje de humedad se determinó por pérdida de peso después del secado. La máxima capacidad de hidratación se determinó hidratando cada componente en exceso de agua por 24 h, a continuación se drenó el exceso de agua y se tomaron 4 muestras en cajas Petri, se pesaron y se secaron a 60°C por 48 horas. La máxima capacidad de hidratación también se determinó por la pérdida de peso entre el componente húmedo y después del secado. Esto se hace para calcular el agua a adicionar al momento de preparar los sustratos, ya que cada componente debe estar a su máxima capacidad de hidratación, y para calcular la humedad teórica del sustrato.

3.6.3. Preparación, esterilización e inoculación de sustratos

El sustrato base se preparó de acuerdo a la formulación reportada en la Tabla 3.2. Para preparar el sustrato el aserrín, cascarilla de algodón, mijo y sorgo molido se mezclaron en seco y se añadió el agua calculada para obtener una humedad de 62%, se dejó hidratar por 24 horas. Después de las 24 horas se añadieron los otros componentes del sustrato (sulfato de amonio, ácido cítrico y sulfato de calcio) y se mezclaron hasta observar una distribución homogénea. Por separado se hidrataron cubos de ePE-PU de 1 cm³ con el agua necesaria para su máxima capacidad de hidratación. Con el sustrato húmedo se llenaron bolsas de polipapel de 15 x 35 cm para los sustratos control con 1500 g de sustrato y bolsas de 20 x 40 cm para los sustratos con ePE-PU. Los sustratos con una sustitución del 5% de la materia orgánica del sustrato por ePE-PU, se llenaron con 1425 g de sustrato básico húmedo y 75 g de espuma húmeda, y los sustratos con 10% de sustitución con ePE-PU, se llenaron con 1350 g de sustrato húmedo y 150 g de espuma húmeda.

Tabla 3.2. Composición en base húmeda del sustrato base para el cultivo de *Lentinula edodes*.

Componentes del sustrato	Composición (g / 100 g de mezcla húmeda)
Aserrín de encino blanco	50
Cascarilla de algodón	36
Mijo	6
Sorgo molido	6
Sulfato de amonio	0.5
Acido cítrico	0.5
Sulfato de calcio	1
Total	100

Durante el llenado de las bolsas de sustrato con los cubos de ePE-PU fue importante distribuir adecuadamente todos los componentes debido a que la ePE-PU es un material de mucha menor densidad que el resto del sustrato. Por ello las bolsas se llenaron alternando capas de ePE-PU con el resto del sustrato, 5 capas

aproximadamente, tratado de que quedara distribuido de manera homogénea en todo el sustrato. En esta fase se tomaron muestras para determinar la humedad antes de la esterilización (4 muestras de cada sustrato tomadas una al inicio, dos intermedias y una al final del llenado).

Los sustratos empacados en bolsas (ocho réplicas por cada sustrato) se esterilizaron en autoclave durante 2 horas a 121°C y 15 lb/in². Las bolsas de los sustratos estériles se dejaron enfriar por 24 horas en autoclave y se llevaron a la campana de flujo laminar para su inoculación. Antes de la inoculación se tomó para cada réplica una muestra de aproximadamente 40 g para determinar la humedad de los sustratos después de la esterilización. A continuación se pesó cada bolsa para calcular la cantidad de inóculo de grano a utilizar. Posteriormente se inocularon con 5% del inóculo de grano, cuidando que quedara bien distribuido en todo el sustrato, cada bolsa con sustrato se comprimió manualmente y se registró el peso final, valor muy importante para determinar la eficiencia biológica.



Figura 3.3. Sustrato con 10% de ePE-PU inoculado con la cepa L9 de *L. edodes* después de 5 semanas de incubación.

A los sustratos inoculados se les colocó en la parte superior de las bolsas un tubo de PVC de 2 pulgadas y el área expuesta fue cubierta con un cuadro de espuma de poliuretano estéril para permitir la respiración del micelio durante el período de incubación. Los sustratos inoculados se incubaron por 8 semanas a 24°C en

oscuridad (Figura 3.3), período durante el cual se observó que los sustratos se invadieran adecuadamente por el micelio limpio. El sustrato era desechado si se observaba alguna contaminación.



Figura 3.4. Sustrato con 10% de ePE-PU inoculado con cepa L15 de *L. edodes* después de 8 semanas de incubación, previo a la inducción de la fructificación.

3.6.4. Inducción de la fructificación y cosecha

Después de las 8 semanas de incubación se retiraron las bolsas de polipapel de los sustratos y se sumergieron en canastillas con agua a 8°C, cuidando que quedaran completamente cubiertos por el agua (Figura 3.4). Las canastillas con el agua y los sustratos se almacenaron en el cuarto frío para que la temperatura permaneciera constante durante 12 h. Trascurrido este tiempo los sustratos fueron llevados al cuarto de fructificación donde permanecieron por 12 semanas con una humedad relativa de 93% a 20 ± 2°C e iluminación artificial las 24 h. A todos los sustratos se les marcó adecuadamente para que fueran identificados individualmente por cepa, nivel de ePE-PU y número de réplica y se distribuyeron de manera aleatoria en los estantes metálicos del cuarto de fructificación.

Durante el período de incubación en algunos de los sustratos aparecieron los primeros primordios, éstos fueron cortados después de inducir la fructificación debido a que generalmente éstos no se desarrollan adecuadamente y pueden causar disminuciones en el valor de eficiencia biológica.



Figura 3.5. Sustrato con esporóforos en desarrollo de cepa L5 de *L. edodes* durante la etapa de fructificación

Una vez en el cuarto de fructificación los sustratos se revisaban diariamente. Los primeros cuerpos fructíferos desarrollados aparecieron entre la primera y segunda semana (Figura 3.5). El tiempo óptimo de su cosecha fue cuando los bordes del sombrero no se habían extendido completamente, los cuerpos fructíferos que cumplían con esta característica eran cosechados y para cada sustrato se registró el peso con y sin estípite, número de piezas y características morfológicas. Una vez que fueron cosechados todos los hongos de una réplica, ésta se dejaba reposar durante una semana para permitir la recuperación del micelio y nuevamente fue inducida la fructificación por inmersión en agua a 8°C por 12 h. Para todas las cepas, sustratos y réplicas se usaron 3 inducciones para la fructificación.

3.6.5. Resultados de producción

Con los datos obtenidos se determinó la producción semanal, producción semanal acumulada, peso promedio por pieza y eficiencia biológica. La eficiencia biológica se calculó con la siguiente fórmula:

Ecuación 2.

$$EB (\%) = \frac{g \text{ de hongo fresco (con o sin estípite)}}{g \text{ de sustrato seco}} \times 100$$

Como se observa en la fórmula previa, para calcular la eficiencia biológica se requiere el peso seco de cada una de las bolsas de sustrato, el cual se calculó usando la humedad de cada uno de los sustratos después de la esterilización y el peso de cada bolsa con sustrato de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Ecuación 3

$$\begin{aligned} & \text{Peso de sustrato seco por bolsa (g)} \\ & = \left(\frac{(\text{g de sustrato húmedo})(100 - \text{Humedad (\%)})}{100} \right) \end{aligned}$$

El peso promedio de los esporóforos se calculó con la siguiente fórmula:

Ecuación 4

$$\text{Peso promedio por pieza} = \frac{\text{Peso de todos los hongos cosechados en un sustrato}}{\text{No hongos cosechados}}$$

Debido a que posterior a la inducción de la fructificación la producción aumentaba, decaía y posteriormente se inducía la fructificación, los datos de producción fueron separados por “brotes” que correspondieron a la producción obtenida entre cada inducción de la fructificación.

Con los datos obtenidos durante la producción se construyeron tablas y gráficas para cada cepa con sus valores de eficiencia biológica acumulada con estípite, eficiencia biológica acumulada sin estípite, proporción de estípite y peso promedio por brotes y totales. Se compararon los valores obtenidos con los dos niveles de sustitución con ePE-PU contra el control sin ePE-PU mediante análisis de varianzas y pruebas de Duncan si se encontraban diferencias significativas.

3.6.6. Tratamiento estadístico de los datos

Todos los análisis de varianza y pruebas de Duncan se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0. Los valores de F de Tablas fueron tomados del libro Diseño y Análisis de Experimentos (Montgomery, 2004).

4. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

4.1 Recuperación de cepas de *L. edodes*

Se partió de cajas con medio de agar extracto de malta (AEM) en refrigeración con cultivos miceliales de cada una de las siguientes cepas dicarióticas de *Lentinula edodes*: L5, L6, L9, L10, L11, L15, L18, L21, L23, L24 y L25 se tomaron dos cajas para cada cepa y se resembraron en medio AEM.



Figura 4.1. Caja invadida con micelio puro de la cepa L9

Las cepas L5, L9 y L21 después de su primera resiembra mostraron crecimiento micelial puro (Figura 4.1) y carácter dicariótico y por tanto fueron resembradas 8 cajas Petri con medio AEM para cada cepa. Las cepas L6, L10 y L15 presentaron contaminaciones en la primera resiembra, pero había zonas con crecimiento sano de donde se realizó la segunda resiembra y sólo las cepas L6 y L10 mostraron crecimiento micelial libre de contaminaciones y de tipo dicariótico. Por ello fueron resembradas también 8 cajas de medio agar extracto de malta.

La cepa L15 resultó contaminada nuevamente por tanto se tomó una caja distinta almacenada en refrigeración para obtener cultivo puro. Por otro lado, de las cepas L11, L18, L23 y L24 no fue posible recuperar cultivos puros libres de contaminantes, por lo que fueron descartadas del experimento. Se logró recuperar finalmente cultivos puros de las cepas L5, L6, L9, L10, L15 y L21 de *L. edodes*.

4.2 Evaluación de la pérdida de peso de ePE-PU por el desarrollo micelial de *L. edodes*

Para estos experimentos se emplearon medios ricos apropiados para el desarrollo micelial de hongos pero usando concentraciones más bajas de las que normalmente se usan con el objetivo de que el micelio de *L. edodes* pudiera desarrollarse en el medio, pero que rápidamente se agotaran los nutrientes en el medio y entonces comenzara a utilizar la ePE-PU como fuente de carbono. La Tabla 4.1 muestra la pérdida en peso de la ePE-PU producida después de 30 días de incubación con las cepas L5, L9 y L15 de *L. edodes*. En La Tabla 4.2 se muestra los resultados de un segundo experimento donde se evaluó la pérdida de peso de ePE-PU por las cepas L6, L10 y L21.

Tabla 4.1. Pérdida de peso de ePE-PU % (mg ePE-PU /100 mg ePE-PU) por cepas L5, L9 y L15 de *Lentinula edodes* en dos medios líquidos a diferentes concentraciones después de 30 días de incubación

Medios líquidos	Concentración (g/L) / (%)*	Pérdida de peso en ePE-PU (%)		
		Cepas de <i>Lentinula edodes</i>		
		L5	L9	L15
EM (g/L)	1	2.0 ± 0.1	3.1 ± 0.5	2.4 ± 0.3
	4	3.3 ± 0.6	5.1 ± 0.6	3.6 ± 0.3
	8	4.0 ± 0.7	7.1 ± 1.3	5.5 ± 0.6
PD (%)*	25*	4.6 ± 1.0	6.4 ± 0.5	7.2 ± 0.5
	50*	9.2 ± 0.7	14.2 ± 1.3	13.6 ± 1.2

*Dilución del medio PD (20 g dextrosa /l de extracto de papa)

Tabla 4.2. Pérdida de peso de ePE-PU % (mg ePE-PU /100 mg ePE-PU) por cepas L6, L10 y L21 de *Lentinula edodes* en dos medios líquidos a diferentes concentraciones después de 30 días de incubación

Medios líquidos	Concentración (g/L) / (%)*	Pérdida de peso en ePE-PU(%)		
		Cepas de <i>Lentinula edodes</i>		L6 ** (Contaminante)
		L10	L21	
EM (g/L)	1	2.1 ± 0.3	3.6 ± 1.3	0.4 ± 0.4
	4	3.1 ± 0.4	4.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4
	8	5.1 ± 0.7	7.5 ± 0.6	0.8 ± 0.6
PD(%)*	25*	6.8 ± 0.3	7.7 ± 1.3	0.5 ± 0.5
	50*	9.7 ± 0.6	12.9 ± 0.8	0.6 ± 0.5

*Dilución del medio PD (20 g dextrosa /l de extracto de papa)

En el experimento se observó que las espumas sufren una pérdida de peso debida únicamente al tratamiento con cloro. Esta pérdida de peso es similar entre si independientemente del medio al que fue expuesta la espuma. Para el primer experimento, la pérdida de peso en los controles fue entre 9.2 y 9.4%, y para el segundo entre 13.1 y 13.8%. Esta pérdida en peso de los controles se resta en cada caso, a la pérdida de peso total para obtener la pérdida de peso que corresponde únicamente a la originada por el crecimiento del micelio de *L. edodes*.

En estos resultados resalta la muy baja pérdida de peso que se observó con la cepa L6, entre 0.4 y 1.7%. También se observó que la cepa L6 se desarrolló principalmente en el medio líquido y no sobre la espuma, como las otras cepas, además con un crecimiento más rápido pero menos abundante. Adicionalmente, a pesar de que la cepa L6 no mostraba un micelio claramente distinto al de las otras cepas, al producir inóculo de grano y al inocular sustratos para fructificación, no colonizó el sustrato de aserrín con el patrón normalmente observado para *L. edodes* y tampoco produjo alguna fructificación. Por lo anterior se determinó que la cepa L6 posiblemente resultó ser un micelio contaminante, distinto de *L. edodes*, por lo que finalmente sólo se evaluaron 5 cepas de *L. edodes*.

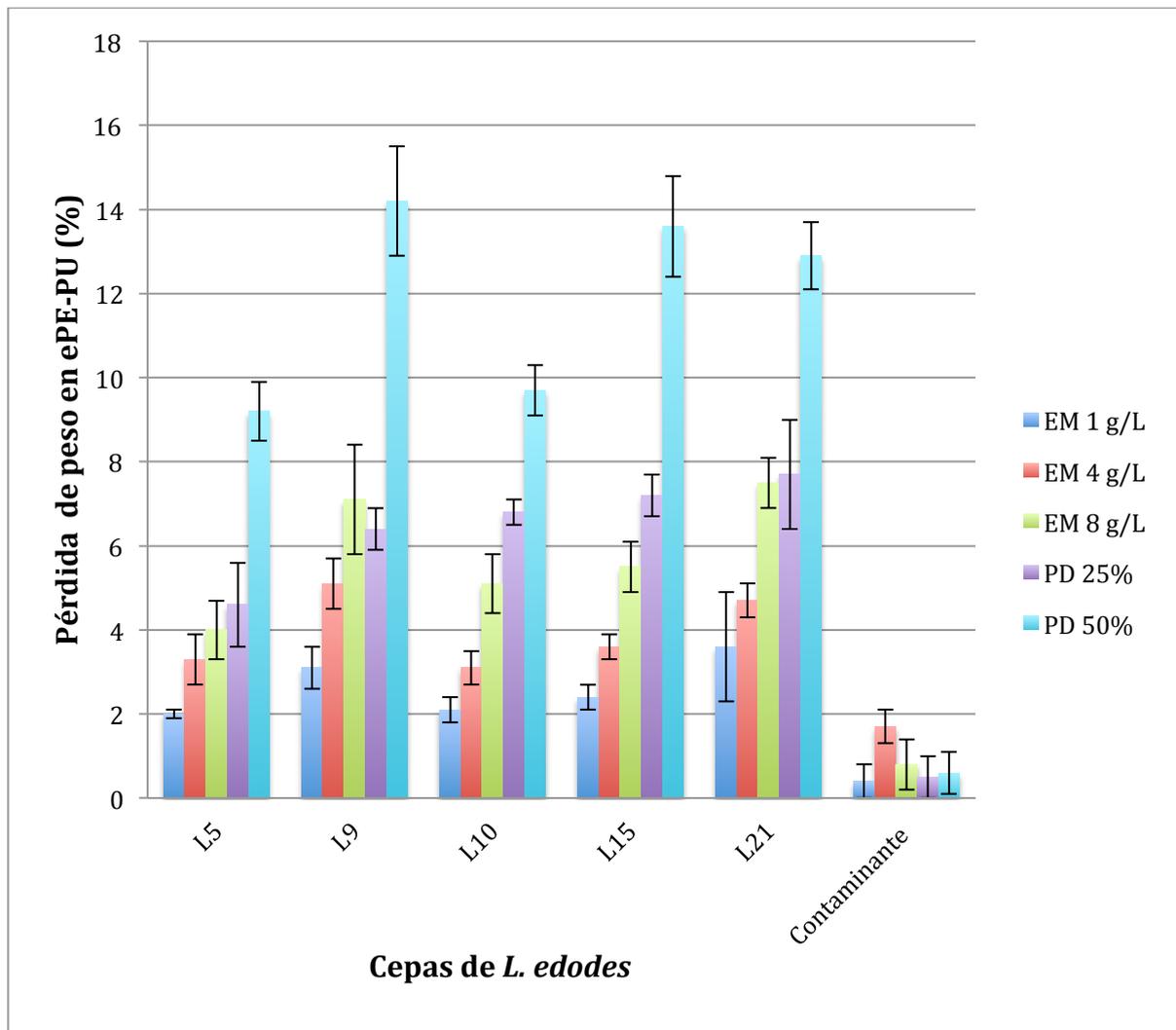


Figura 4.2 Pérdida de peso de espuma de PE-PU (%) por crecimiento micelial de 5 cepas de *Lentinula edodes* en dos medios líquidos a diferentes concentraciones después de 30 días de incubación

Con las 5 cepas de *L. edodes* evaluadas se observó la mayor pérdida de peso en los medios con mayor concentración de nutrientes, en papa dextrosa al 50% fue 9.2, 14.2 y 13.6% para las cepas L5, L9 y L15 y 9.6 y 12.9% para las cepas L10 y L21 (Figura 4.2). La misma tendencia se observó en los medios con extracto de malta, es decir, una mayor degradación a 8 g/L, 4, 7.1 y 5.5% para las cepas L5, L9 y L15 y 5.1 y 7.5% para las cepas L10 y L21. La menor pérdida de peso se registró en el extracto de malta con 1 g/L con pérdidas de peso de 2, 3.1 y 2.4% para las cepas L5, L9 y L15 respectivamente y 2.1 y 3.6% para las cepas L10 y L21.

En la Figura 4.3 se observa que en todas las espumas inoculadas se presentó crecimiento micelial en el medio pero preferentemente sobre las ePE-PU. En los medios con mayor concentración de nutrientes se observó mayor crecimiento micelial que en las espumas de los medios con menor concentración de nutrientes, fenómeno observado para todas las cepas. En los medios controles (sin inocular) no se observó ningún tipo de crecimiento



Ceba L21 (PD 50%)



Ceba L15 (EM 8 g/l)



Ceba L21 (EM 4 g/l)



Ceba L15 (EM 1 g/l)

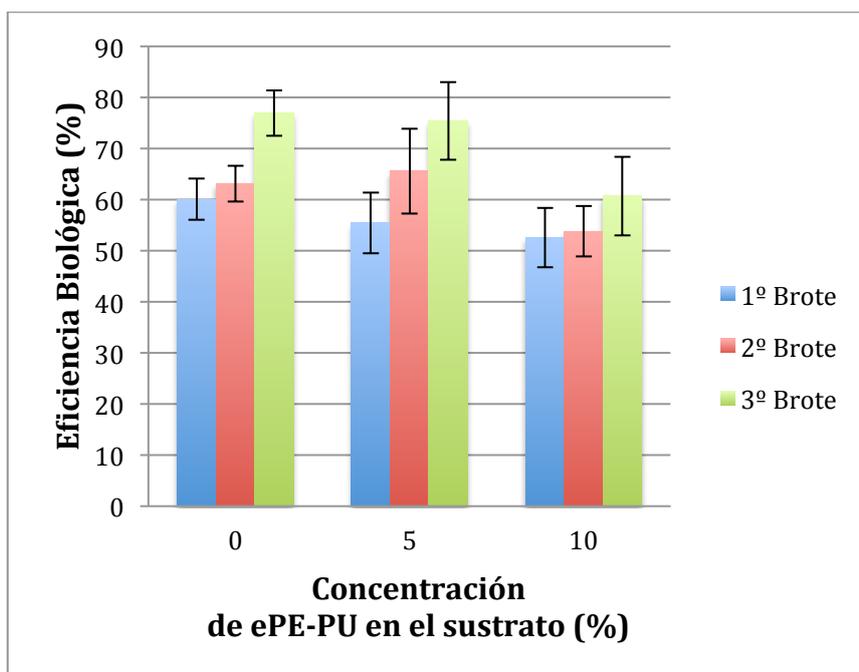
Figura 4.3. Desarrollo micelial de cepas de *L. edodes* sobre ePE-PU en medio papa dextrosa y extracto de malta

4.3 Producción de esporóforos de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU

Para conocer si la eficiencia biológica (EB) es afectada al sustituir parte del sustrato convencional por ePE-PU se realizó el siguiente experimento. La producción de 3 cepas (L5, L9 y L15) de *L. edodes* se comparó en un sustrato control contra sustratos con 5 y 10% de ePE-PU. Para cada cepa se determinó la eficiencia biológica con estípite y sin estípite, la eficiencia biológica para hongos sin estípite al rendimiento máximo significativo (RMS), la proporción de estípite y el tamaño promedio de los esporóforos cosechados. Para determinar si se presentaron diferencias significativas en los resultados de eficiencia biológica se realizaron análisis de varianza al RMS, proporción de estípite y peso promedio. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras y tablas.

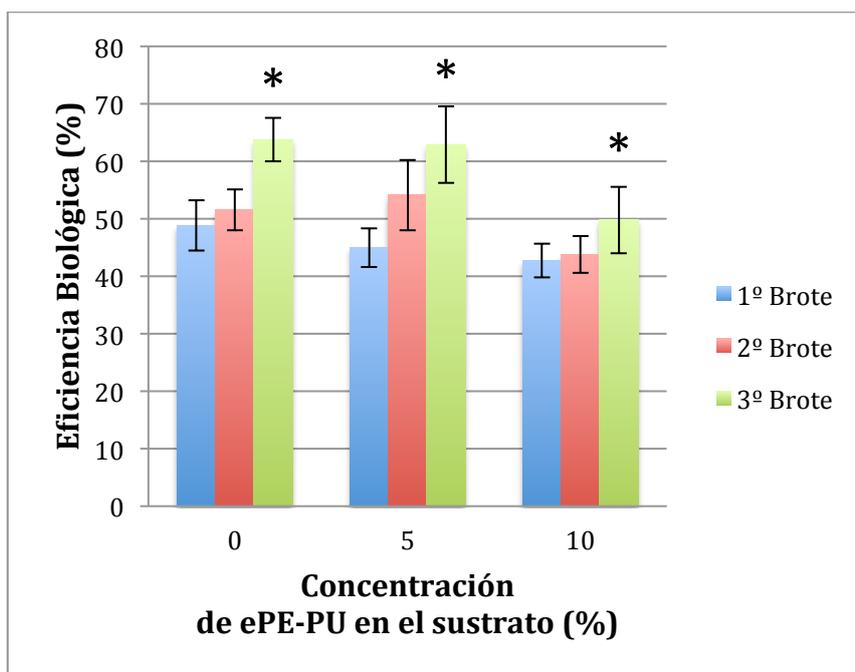
4.3.1 Producción de esporóforos de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU

La Figura 4.4 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **con estípite** (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L5. Las eficiencias biológicas totales del sustrato control y del sustrato con 5% de ePE-PU, 76.9 ± 4.4 y 75.4 ± 7.6 , respectivamente, fueron similares, mientras que el sustrato con 10% de ePE-PU presentó una eficiencia biológica total menor, 60.7 ± 7.7 . También se observa que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos, la cual es incluso mayor que la suma del 2^o y 3^{er} brotes en todos los casos. Las eficiencias biológicas del primer brote son similares, 60.1 ± 4.0 , 55.4 ± 6.0 y 52.6 ± 5.8 para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. En el segundo brote, las eficiencias registradas para los sustratos con 0 y 10% de ePE-PU fueron muy bajas, 3.0 y 1.3 %, respectivamente, mientras que para el sustrato con 5% fue ligeramente mayor, 10.2%. Para el tercer brote, los sustratos con ePE-PU (5 y 10%) presentaron eficiencias biológicas bajas 9.9 y 6.9% (ver Anexos I, Tablas 1.1 y 1.2).



La Figura 4.4 Eficiencia biológica acumulada por brotes de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos con estípite).

La Figura 4.5 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **sin estípite** (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L5. Las eficiencias biológicas totales del sustrato control y del sustrato con 5% de ePE-PU, 63.8 ± 3.8 y $62.9 \pm 6.6\%$, respectivamente, fueron similares, mientras que el sustrato con 10% de ePE-PU presentó una eficiencia biológica menor, 49.8 ± 5.8 . También se observó que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos, la cual es mayor que la suma del 2º y 3º brotes para todos los casos. Las eficiencias biológicas del primer brote son similares, 48.9 ± 4.4 , 45 ± 3.3 y 42.7 ± 2.9 para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. Las eficiencias biológicas del segundo brote para los sustratos con 0 y 10% de ePE-PU fueron muy bajas, 2.7 y 1.1%, respectivamente, mientras que para el sustrato con 5% fue ligeramente mayor, 9.2%. Para el tercer brote los sustratos con ePE-PU (5 y 10%) presentaron eficiencias biológicas bajas, 8.8 y 6%, respectivamente, menores que el sustrato control de 12.2% (ver Anexos I, Tabla 1.3).



* Brote en el que se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS)

Figura 4.5. Eficiencia biológica acumulada por brotes de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos sin estípite).

Para identificar el brote donde se obtiene el rendimiento significativo máximo (RMS) se tomaron los valores de eficiencia biológica acumulada para los hongos sin estípite y se realizó un análisis de varianza para cada nivel de ePE-PU con el objeto de observar si había diferencias significativas entre los brotes. En los casos donde se encontraron diferencias significativas o altamente significativas se utilizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan para identificar el brote donde se obtenía el RMS. En la Tabla 4.3 se presentan los resultados para los tres niveles de ePE-PU para la cepa L5, donde se observa que el RMS se alcanzó hasta el tercer brote. En el sustrato control y en el sustrato con 10% de ePE-PU no se observó un incremento significativo entre el primer y segundo brote pero si con el tercero. En el sustrato con 5% de ePE-PU los incrementos entre el primero y segundo brote y entre el segundo y tercer fueron significativos (ver Anexo 2, Tablas 2.1 a 2.6).

Tabla 4.3. Análisis de máximo rendimiento significativo para cepa L5 en sustratos con ePE-PU (0, 5 y 10%)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada por brote de hongos de cepa L5 sin estípite (g hongo fresco / 100 g sustrato seco)		
	Brotos		
	1	2	3
0	48.9 ± 4.4 a	51.5 ± 3.6 a	63.8 ± 3.8 b
5	45.0 ± 3.3 a	54.1 ± 6.2 b	62.9 ± 6.6 c
10	42.7 ± 2.9 a	43.8 ± 3.2 a	49.8 ± 5.8 b

Letra diferentes para un mismo contenido de ePE-PU indican diferencias significativas según Duncan ($\alpha = 0.05$).

El cuadro remarcado indica el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

En la Figura 4.6 se observa la proporción que representa el estípite respecto de todo el cuerpo fructífero de la cepa L5 en los tres diferentes sustratos (0, 5 y 10% de ePE-PU) para cada brote y total. Para el primer brote se observa que prácticamente no hay diferencia en la proporción de estípite, el estípite representó 19.6, 18 y 20% para los sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. En los brotes posteriores se observa en todos los sustratos una menor proporción de estípite respecto a su primer brote que van del 9.3% para el segundo brote en los sustratos con 5% de ePE-PU hasta 13.5% para el tercer brote de los sustratos con 10% de ePE-PU. La proporción de estípite al considerar la producción total muestra valores semejantes en los sustratos con 0 y 5% de ePE-PU, 16.7 ± 1.9 , $16.8 \pm 2.3\%$ respectivamente, mientras que en el sustrato con 10% presentó un valor mayor, 19.5 ± 3.7 (ver Anexo 1, Tabla 1.4).

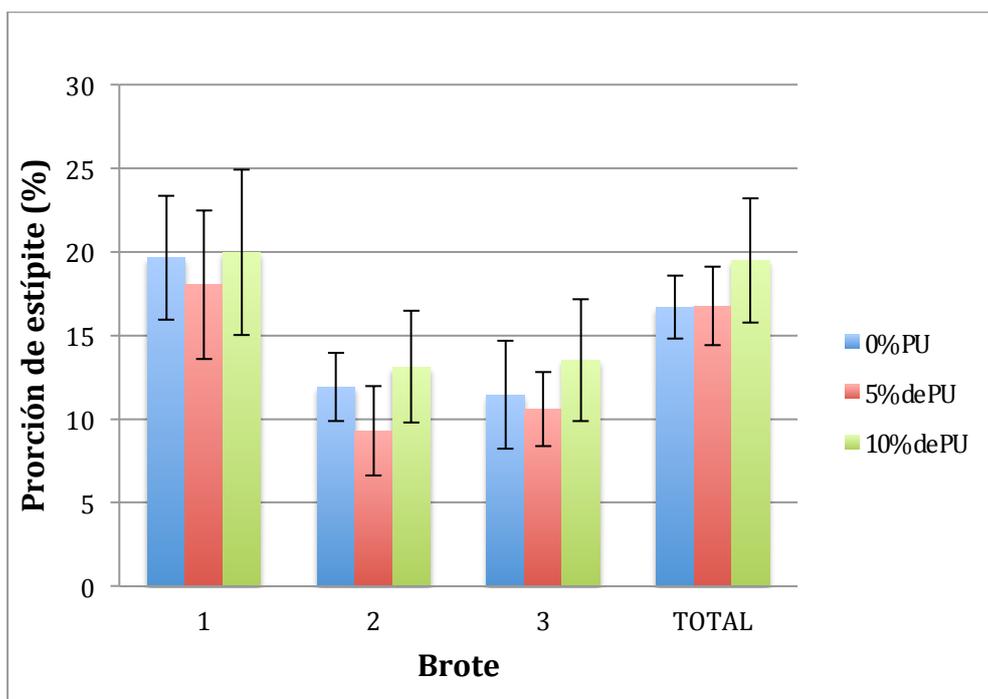


Figura 4.6 Proporción de estípites (%) en esporóforos de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

En la Figura 4.7 se presentan los resultados del peso promedio de los esporóforos de la cepa L5 en los tres distintos sustratos, con 0, 5 y 10% de ePE-PU. Se calculó el peso promedio por brote y también el peso promedio total. Para el primer brote los esporóforos del sustrato con 5% de ePE-PU fueron los más pesados (más grandes), con un peso promedio de 16 g y los del sustrato control los menos pesados (más pequeños) con un peso promedio de 9.2 g. Para el segundo brote se observa una tendencia similar, aunque pesos promedio mayores a los del primer brote. En el tercer brote, los esporóforos del sustrato control se vuelven más pesados (grandes) que los esporóforos de los sustratos con 10% de ePE-PU. Respecto al peso promedio total, se observa que el sustrato con 5% de ePE-PU produjo los hongos más grandes (18.5 g por pieza) seguido por los esporóforos del sustrato control (14.1 g por pieza) mientras que con 10% de ePE-PU se produjeron los menos pesados (10.6 g por esporóforo) (ver Anexo 1, Tabla 1.5).

En las figuras 4.6 y 4.7 es importante aclarar que las barras de los totales no corresponden al promedio de los brotes sino al promedio de toda la producción. Se observa también que los valores del primer brote y del total son muy parecidos debido a que los brotes 2 y 3 presentaron una baja producción de esporóforos

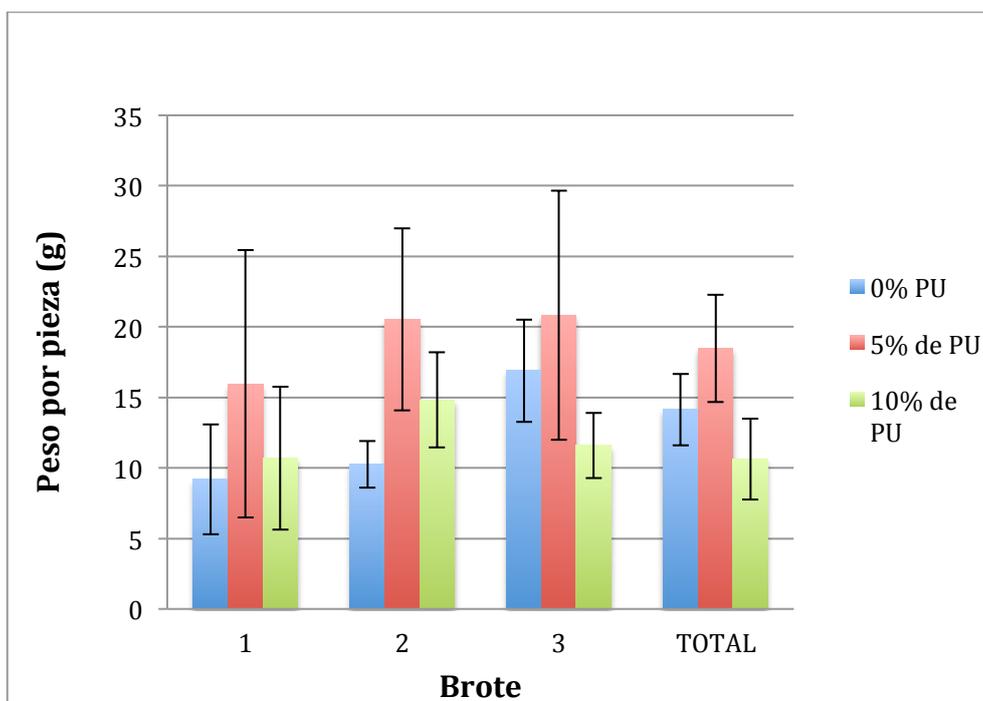


Figura 4.7. Peso promedio de esporóforos (g por pieza) de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

4.3.2 Producción de esporóforos de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU

La Figura 4.8 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **con estípite** (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L9. Las eficiencias biológicas totales del sustrato control y del sustrato con 5% de ePE-PU, 70.4 ± 6.0 y 82.1 ± 10.3 , respectivamente, fueron similares, mientras que el sustrato con 10% de ePE-PU presentó una eficiencia biológica total menor, 68.7 ± 9.3 . También se observa que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos la cual es incluso mayor que la suma del resto de los brotes en todos los casos; para los sustratos con ePE-PU (5 y 10%) el primer brote representó el 78 y 90% de la eficiencia biológica total, respectivamente, mientras que para el control representó solo el 67% (ver Anexo 1, Tabla 1.6 y 1.7).

Las eficiencias biológicas para el primer brote de los sustratos con espuma de PE-PU (5 y 10%), 67.4 ± 15.7 y 62.9 ± 9.3 , respectivamente, fueron similares, mientras que el sustrato control presentó una eficiencia biológica menor, $48.6 \pm 4.1\%$. En la cepa L9 se observa también la misma tendencia que en la cepa L5 ya que después del primer brote los siguientes tuvieron eficiencias biológicas más bajas. Los

mayores incrementos en las eficiencias biológicas se registraron para los sustratos con 0% de ePE-PU, hasta 12%, en el segundo brote y los que menores incrementos registraron fueron los sustratos con 10% de ePE-PU con una eficiencia de 1.7 para el tercer brote (ver Anexo I, Tabla 1.7).

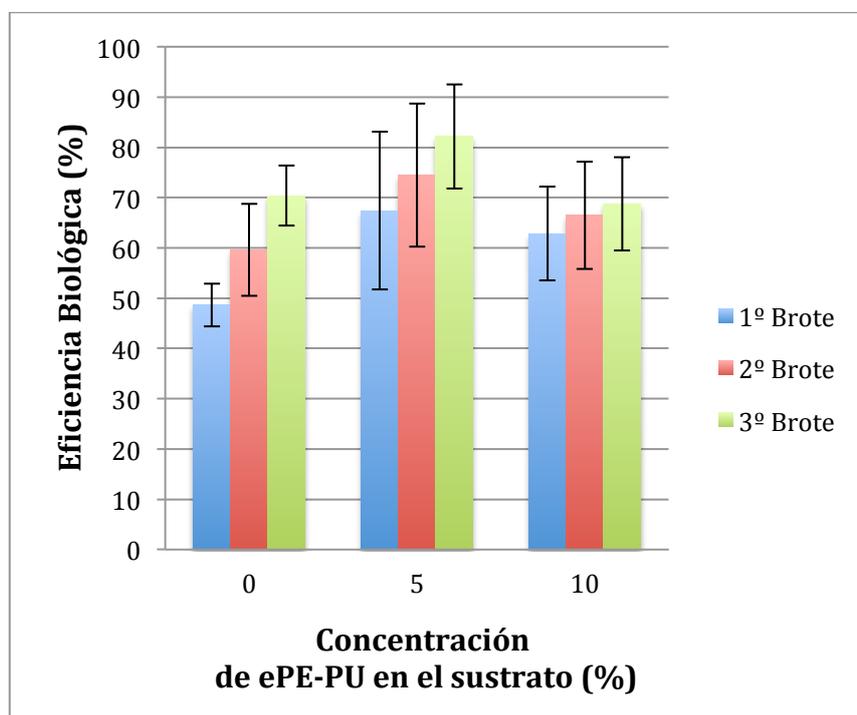
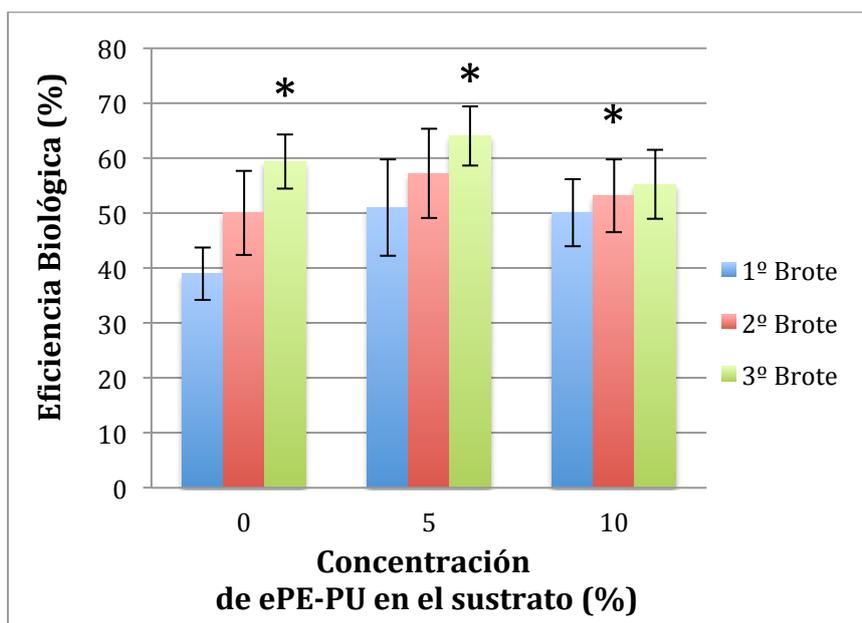


Figura 4.8. Eficiencia biológica acumulada de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos con estípite).

La Figura 4.9 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **sin estípite** (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L9. No se observaron diferencias significativas entre las eficiencias biológicas totales del sustrato control y del sustrato con 5% de ePE-PU, 59.4 ± 4.9 , $64.0 \pm 5.4\%$, respectivamente, mientras que el sustrato con 10% de ePE-PU presentó una eficiencia biológica significativamente menor, 55.2 ± 6.3 . También se observó que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos la cual es incluso mayor que la suma del 2º y 3º brote para todos los casos; para los sustratos con ePE-PU (5 y 10%) el primer brote representó el 80 y 89% de la eficiencia biológica total, respectivamente, mientras que para el control representó sólo el 65%.



* Brote en el que se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Figura 4.9. Eficiencia biológica acumulada por brotes de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos sin estípite).

Las eficiencias biológicas para el primer brote de los sustratos con ePE-PU 5 y 10%, 51 ± 3.1 y $50 \pm 6.1\%$, respectivamente, no muestran diferencia significativa entre si, mientras que el sustrato control presentó una eficiencia biológica en el primer brote significativamente menor, $39 \pm 4.8\%$ (ver Anexo 1 Tabla 1.8). Para la cepa L9 se observa la misma tendencia que para la cepa L5 ya que después del primer brote, los siguientes brotes tuvieron eficiencias biológicas más bajas, los mayores incrementos en las eficiencias biológicas se registraron para el sustrato con 0% de ePE-PU de hasta 11.1%, en el segundo brote y los menores incrementos fueron para los sustratos con 10% de ePE-PU con incremento en la eficiencia biológica de 1.5% para el tercer brote (ver Anexo 1 Tabla 1.8).

Para identificar el brote donde se obtiene el rendimiento significativo máximo (RMS) se tomaron los valores de eficiencia biológica acumulada para los hongos sin estípite y se realizó un análisis de varianza para cada nivel de ePE-PU con el objeto de observar si había diferencia significativa entre los brotes. En los casos donde se encontraron diferencias significativas o altamente significativas se realizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan para identificar el brote donde se obtenía el RMS. En la Tabla 4.4 se presentan los resultados para los tres niveles de ePE-PU para la cepa L9. Se observa que para los sustratos con 0 y 5% de ePE-PU el rendimiento

máximo significativo se alcanzó hasta el tercer brote, mientras que para el sustrato con 10% de ePE-PU se alcanzó en el segundo brote. Para los sustratos con 5 y 10% cada brote representó un incremento significativo en la eficiencia biológica, mientras que para el sustrato con 10% no hubo un incremento significativo entre segundo y tercer brote (ver Anexo 2 Tablas 2.7 a 2.12).

Tabla 4.4. Análisis de máximo rendimiento significativo para cepa L9 en sustratos con ePE-PU (0, 5 y 10%)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada por brote de hongos de cepa L9 sin estípites (g hongo fresco/100 g sustrato seco)		
	Brotos		
	1	2	3
0	39.0 ± 4.8 a	50.0 ± 7.6 b	59.4 ± 4.9 c
5	51.0 ± 8.8 a	57.2 ± 8.1 b	64.0 ± 5.4 c
10	50.0 ± 6.1 a	53.1 ± 6.7 ab	55.2 ± 6.3 b

Letra diferentes para un mismo contenido de ePE-PU indican diferencias significativas según Duncan ($\alpha = 0.05$).

El cuadro remarcado indica el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

En la Figura 4.10 se observa la proporción que representa el estípites respecto de todo el cuerpo fructífero de la cepa L9 en los tres diferentes sustratos (0, 5 y 10% de ePE-PU) para cada brote y total. En esta cepa se observó diferencia en la proporción de estípites entre los diferentes brotes, especialmente entre el primer brote con respecto al segundo y tercer brote; en el primer brote los esporóforos presentaron entre 17.1 y 23% de estípites, mientras que para el segundo y tercer brote la proporción de estípites fue entre 10 hasta 15%. El primer brote, que es el de mayor producción, se observó la mayor proporción de estípites en los esporóforos. Al considerar la producción total, se observa que la proporción de estípites de los esporóforos de los sustratos con ePE-PU, 5 y 10% el estípites representó 20.5 ± 2.6 y $20.2 \pm 2.9\%$, respectivamente, valores mayores que el del sustrato control donde el estípites sólo representó $16.1 \pm 1.2\%$ (ver Anexo 1, Tabla 1.9).

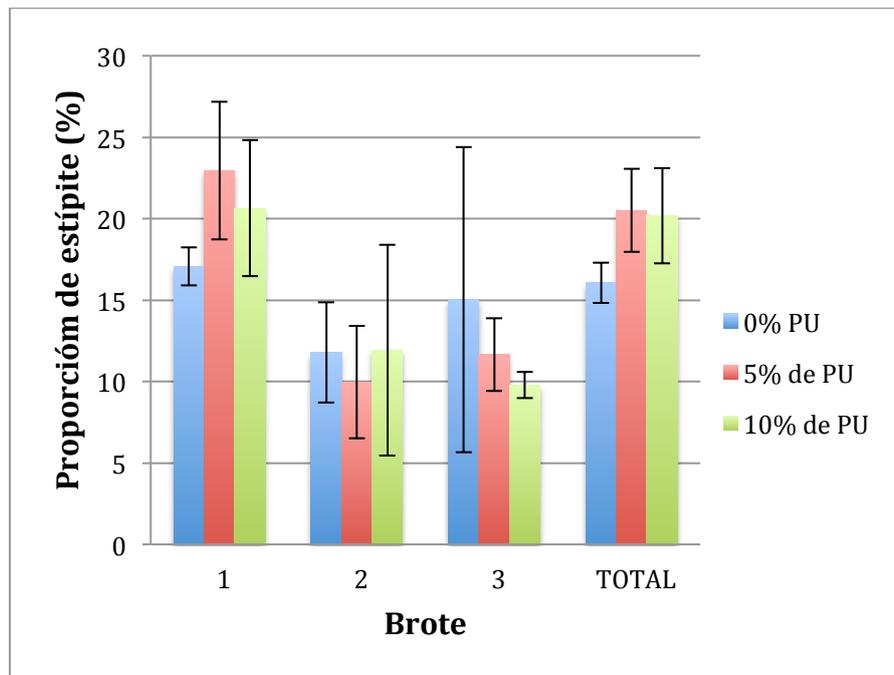


Figura 4.10. Proporción de estípites (%) en esporóforos de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

En la Figura 4.11 se presentan los resultados del peso promedio de los esporóforos de la cepa L9 en los tres distintos sustratos 0, 5 y 10% de ePE-PU. Se calculó el peso promedio por brote y también el peso promedio total. En el primer brote no se observa diferencia en los pesos promedio de los esporóforos de los tres sustratos, con pesos 6.3, 5.8 y 6 g por pieza para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. En el segundo y tercer brote se observa en todos los sustratos esporóforos más pesados (más grandes) que en el primer brote. En el segundo brote se observa un mayor peso promedio de los esporóforos de los sustratos con ePE-PU, 12 y 11.9 g para 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente que en los esporóforos del sustrato control, 8.2 g. En el tercer brote se observan para los tres sustratos los esporóforos más pesados (más grandes). El peso promedio total no muestra diferencia entre los tres sustratos, 9.1 ± 1.6 , 9.4 ± 2.1 y 8.9 ± 2 g por cada pieza para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. Se observa también que en un mismo sustrato el peso promedio varía mucho dependiendo del brote, pero la variación es menor entre diferentes sustratos y brotes similares, siendo el primer brote el que produce los hongos menos pesados (más pequeños) y el último los más pesados (más grandes) (ver Anexo 1, Tabla 1.10).

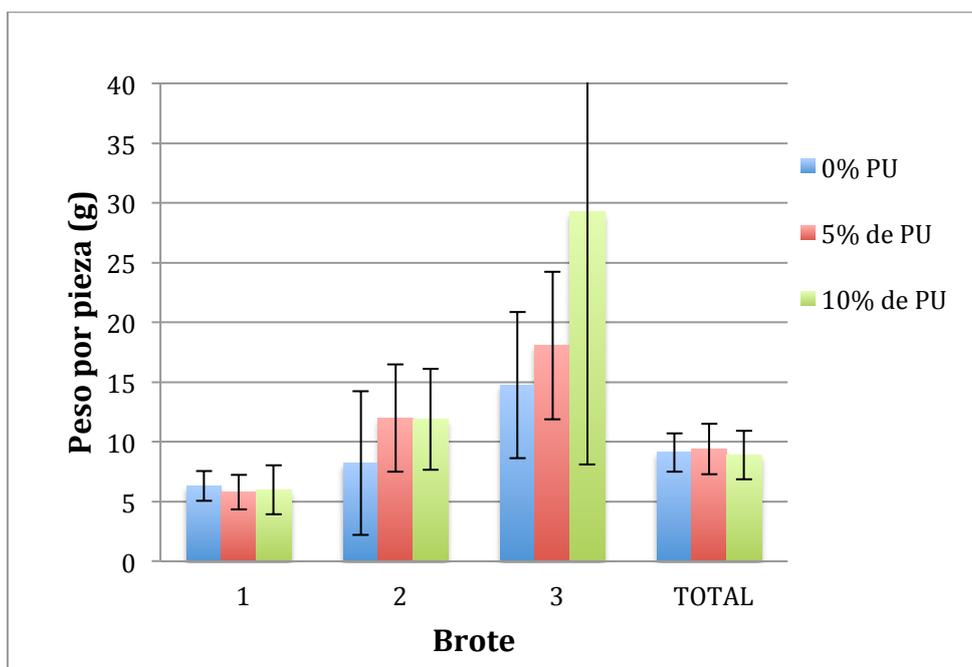


Figura 4.11. Peso promedio de esporóforos (g por pieza) de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

En las figuras 4.10 y 4.11 es importante aclarar que las barras de los totales no corresponden al promedio de los brotes sino al promedio de toda la producción. Se observa también que los valores del primer brote y del total son muy parecidos debido a que los brotes 2 y 3 presentaron una baja producción de esporóforos.

4.3.3 Producción de esporóforos de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU

La Figura 4.12 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **con estípite** (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L15. La eficiencia biológica total fue similar entre los sustratos con ePE-PU, 70.3 ± 8.5 y $67.4 \pm 13.3\%$ para 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente mientras que el sustrato control presentó una eficiencia biológica total menor, 64.9 ± 5.6 . También se observa que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos, la cual es incluso mayor que la suma del 2º y 3º brotes para todos los casos. Las eficiencias biológicas del primer brote son similares, 41.9 ± 2.8 , 45.8 ± 9.1 y $46.2 \pm 2\%$ para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. En el segundo brote la eficiencia de los sustratos con 0 y 5% de ePE-PU es muy similar 13.3 y 11.7% , respectivamente. Para el tercer brote se observa similitud entre las

eficiencias biológicas los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU, 12.8 y 13.2, respectivamente (ver Anexo 1 Tablas 1.11 y 1.12).

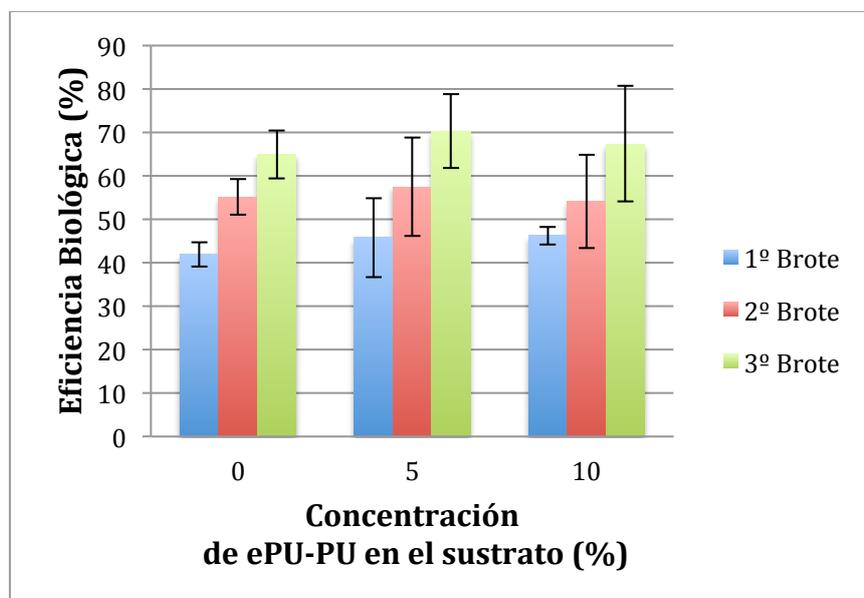
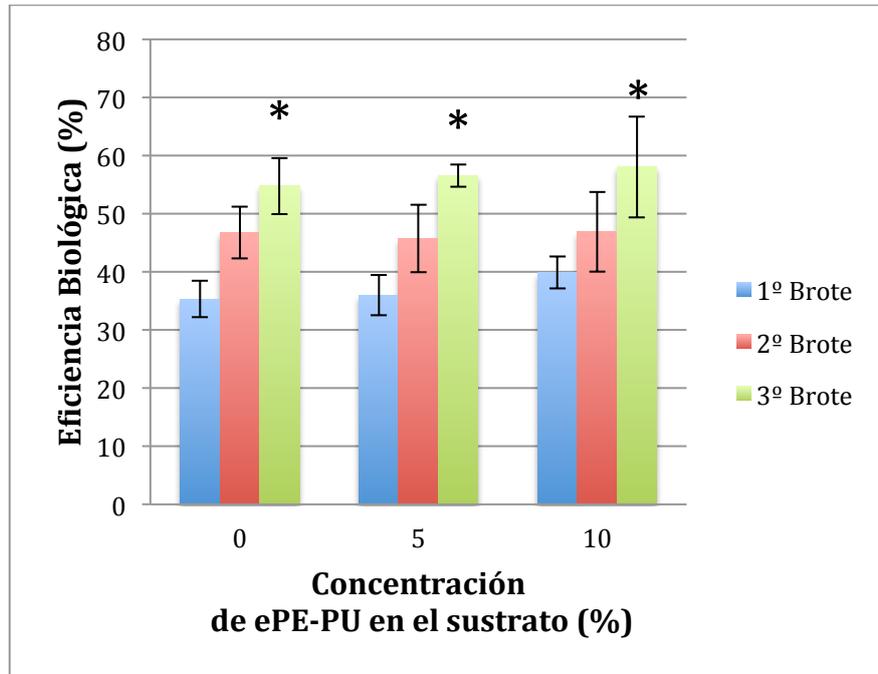


Figura 4.12. Eficiencia biológica acumulada de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos con estípite).

La Figura 4.13 muestra los resultados de eficiencia biológica acumulada **sin estípite** (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco) por brotes para la cepa L15. La eficiencia biológica total fue similar entre los sustratos con ePE-PU, 56.6 ± 1.9 y $58.1 \pm 8.7\%$ para 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente, mientras que el sustrato control presentó una eficiencia biológica total menor, $54.8 \pm 4.8\%$. También se observa que la mayor eficiencia biológica se obtuvo durante el primer brote para los tres sustratos, la cual es incluso mayor que la suma del 2º y 3º brotes para todos los casos. Las eficiencias biológicas del primer brote fueron similares, 35.4 ± 3.1 , 36 ± 3.5 y $39.9 \pm 2.8\%$ para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente. Las eficiencias biológicas del segundo brote en los sustratos con 0 y 5% de ePE-PU fueron muy similares, 11.4 y 9.8%, respectivamente. Para el tercer brote se encuentra similitud entre las eficiencias biológicas los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU, 10.8 y 11.2, respectivamente (ver Anexo 1, Tabla 1.13).



* Brote en el que se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS)

Figura 4.13. Eficiencia biológica acumulada de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (hongos sin estípites).

Para identificar el brote donde se obtiene el rendimiento significativo máximo (RMS) se tomaron los valores de eficiencia biológica acumulada para los hongos sin estípites y se realizó un análisis de varianza para cada nivel de ePE-PU con el objeto de observar si había diferencia significativa entre los brotes. En los casos donde se encontraron diferencias significativas o altamente significativas se utilizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan para identificar el brote donde se obtenía el RMS. En la Tabla 4.5 se presentan los resultados para los tres niveles de ePE-PU para la cepa L15. Se observa que para los tres niveles de ePE-PU el RMS se alcanzó hasta el tercer brote. En el sustrato control y en el sustrato con 5% de ePE-PU se observó un incremento significativo entre el primer y segundo brote y entre el segundo y tercero. En el sustrato con 10% de ePE-PU los incrementos entre el primero y segundo brote no presentaron un incremento significativo, pero sí entre el segundo y el tercer brote (ver Anexo 2 Tablas 2.13 a 2.18).

Tabla 4.5. Análisis de máximo rendimiento significativo para cepa L15 en sustratos con ePE-PU (0, 5 y 10%)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada por brote de hongos de cepa L15 sin estípite (g hongo fresco /100 g sustrato seco)		
	Brotos		
	1	2	3
0	35.4 ± 3.1 a	46.8 ± 4.4 b	54.8 ± 4.8 c
5	36.0 ± 3.5 a	45.8 ± 5.8 b	56.6 ± 1.9 c
10	39.9 ± 2.8 a	46.9 ± 6.8 a	58.1 ± 8.7 b

Letra diferentes para un mismo contenido de ePE-PU indican diferencias significativas según Duncan ($\alpha = 0.05$).

El cuadro remarcado indica el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

En la Figura 4.14 se observa la proporción que representa el estípite respecto de todo el cuerpo fructífero de la cepa L15 en tres diferentes sustratos (0, 5 y 10% de ePE-PU) para cada brote y total. Para el primer brote se observa que prácticamente no hay diferencia en la proporción de estípite para los esporóforos de los sustratos con 0 y 10% de ePE-PU, el estípite representó 16.7% para ambos sustratos, y la proporción de estípite para los hongos del sustrato con 5% de ePE-PU fue mayor, de 20.6%. En el segundo brote se observa diferencia en la proporción de estípite de los tres diferentes sustratos, para este brote la mayor proporción de estípite se observó para los sustratos con 5% de ePE-PU, 16.8% y la menor para los sustratos con 10% de ePE-PU, 10.8%. En el tercer brote no se observa diferencia en la proporción de estípite para ninguno de los sustratos con proporciones de 16.8, 16 y 15.5% para 0, 5 y 10% de ePE-PU respectivamente. Al considerar la producción total no se observaron diferencias en la proporción de estípite, 15.7 ± 0.8 , 16.2 ± 1.9 y $15.6 \pm 1.5\%$ para 0, 5 y 10% de ePE-PU, respectivamente (ver Anexo 1, Tabla 1.14).

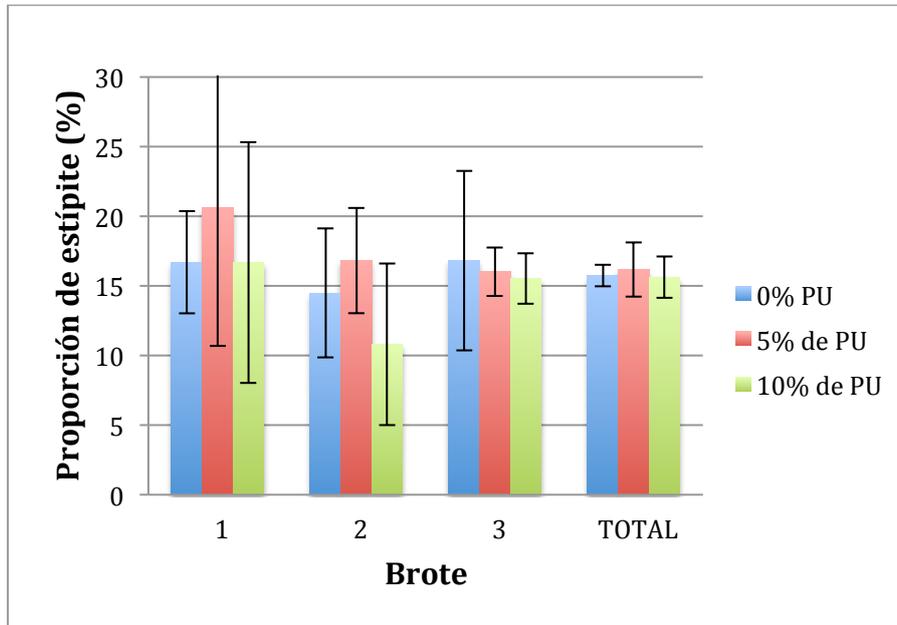


Figura 4.14. Proporción de estípite (%) en esporóforos de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

En la Figura 4.15 se presentan los resultados del peso promedio por pieza de los esporóforos de la cepa L15 en los tres distintos sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU. Se calculó el peso promedio por brote y también el peso promedio total. Para el primer brote los esporóforos de los sustratos con 10% de ePE-PU fueron los más pesados (más grandes), con un peso promedio de 19.7 g y los del sustrato control y con 5% de ePE-PU los menos pesados (más pequeños) con un peso promedio de 9.1 y 11.3 g, respectivamente. Para el segundo brote la tendencia fue similar con pesos promedio mayores, desde 16.3 g para el control, hasta 32.1 g para el sustrato con 10% de ePE-PU. En el tercer brote la tendencia es la misma, con diferencia entre los tres. En el peso promedio total se observaron diferencias entre los tres sustratos, los hongos menos pesados, 11.8 g, se produjeron en el sustrato control, en el sustrato con 5% de ePE-PU se obtuvo un peso promedio de 17.2 g y los esporóforos más pesados (más grandes) se obtuvieron en el sustrato con 10% de ePE-PU, con un peso promedio de 25 g (ver Anexo 1, Tabla 1.15).

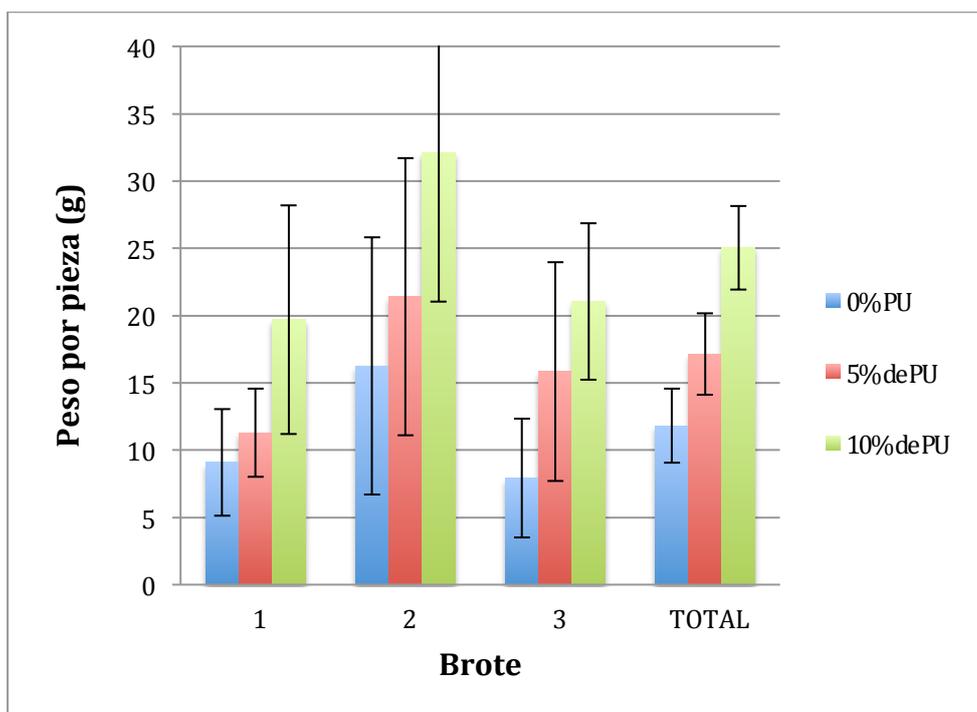


Figura 4.15. Peso promedio de esporóforos (g por pieza) de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

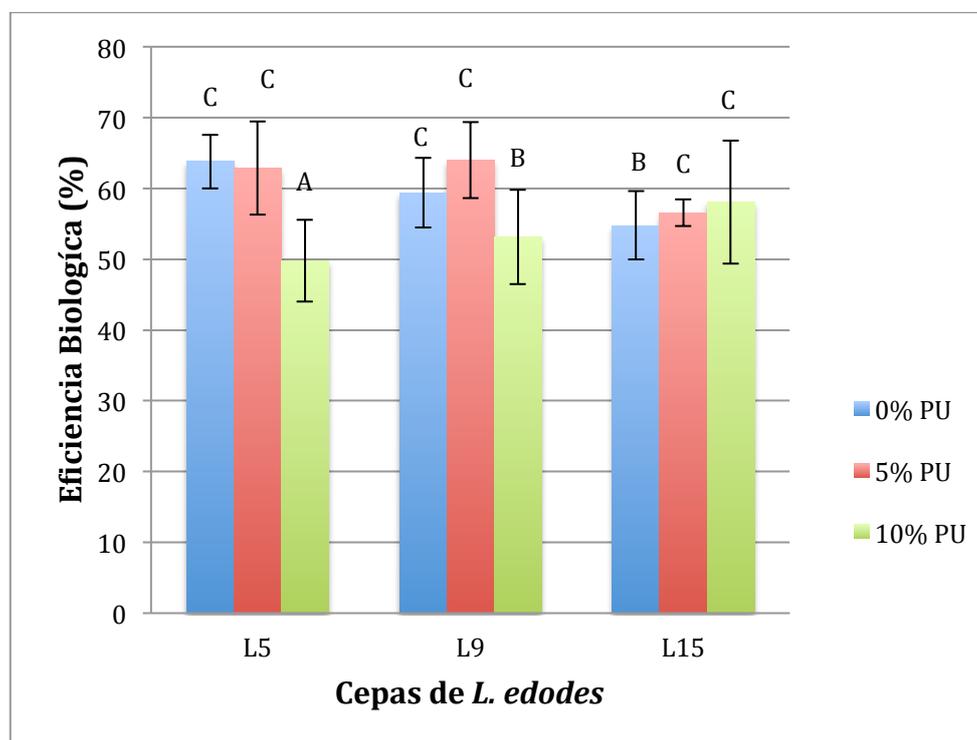
En las figuras 4.14 y 4.15 es importante aclarar que las barras de los totales no corresponden al promedio de los brotes sino al promedio de toda la producción. Se observa también que los valores del primer brote y del total son muy parecidos debido a que los brotes 2 y 3 presentaron una baja producción de esporóforos.

4.3.4 Comparación de resultados globales de las cepas L5, L9 y L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU

La Figura 4.16 presenta los resultados de eficiencia biológica total al RMS sin estípites (g de hongo fresco sin estípites /100 g sustrato seco) para las cepas; L5, L9 y L15 de *L. edodes* en los tres diferentes sustratos (sustrato con 0, 5 y 10% de ePE-PU). Las mayores eficiencias biológicas se obtuvieron para las cepas L5 y L9 en los sustratos que contenían 0 y 5% de ePE-PU y para la cepa L15 en los sustratos con, 5 y 10% de ePE-PU (sin presentar diferencia significativa entre sí) (ver Anexo 2 Tablas 2.19 y 2.20).

En la Figura 4.16 también se observa que las eficiencias biológicas de las cepas L5 y L9 en el sustrato control no presentaron diferencias significativas entre sí y que fueron significativamente mayores que la eficiencia de la cepa L15 en el sustrato

control. La eficiencia biológica en los sustratos con 5% de ePE-PU fue igual para las tres cepas. En los sustratos con 10% de ePE-PU la eficiencia biológica de la cepa L15 fue significativamente mayor que la cepa L9 obteniéndose la menor eficiencia biológica en el sustrato inoculado con la cepa L5.



Letras diferentes indican diferencias significativas para interacción cepa x nivel de ePE-PU.

Figura 4.16. Eficiencia biológica (sin estípite) al RMS para 3 cepa de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

La Figura 4.17 muestra los resultados de eficiencia biológica del primer brote (g de hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco) para las cepas; L5, L9 y L15 de *L. edodes* en los tres diferentes sustratos (sustrato control sin ePE-PU, 5 y 10% de ePE-PU). El primer brote fue el más abundante para todas las cepas y los mayores rendimientos se obtuvieron con la cepa L5, que mostró la mayor EB en los sustratos con 0 y 5% de ePE-PU y con la cepa L9 en los sustratos con ePE-PU (5 y 10%). Con la cepa L15 la mayor EB se obtuvo en el sustrato con 10% de ePE-PU (ver Anexo 2 Tablas 2.21 y 2.22).

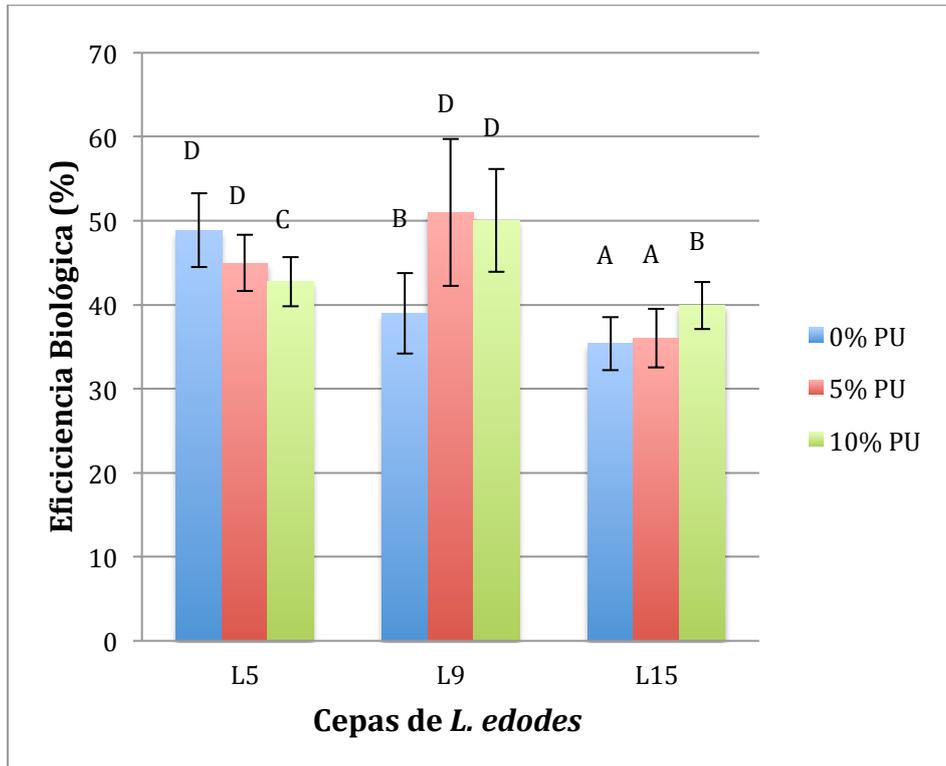


Figura 4.17. Eficiencia biológica (sin estípites) al primer brote para 3 cepas de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

La Figura 4.18 muestra los resultados de la proporción de estípites (%) para las cepas; L5, L9 y L15 de *L. edodes* en los tres diferentes sustratos (0, 5 y 10% de ePE-PU). Se observa una proporción de estípites significativamente mayor (entre 19 y 20%) con la cepa L5 en el sustrato con 10% ePE-PU y con la cepa L9 en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU que en el resto de las condiciones, tanto en los sustratos control con 0 y 5% de espuma de PE-PU de las 3 cepas, como con la cepa L15 en el sustrato con 10% de espuma de PE-PU, entre 15 y 16% (ver Anexo 2, Tablas 2.23 y 2.24).

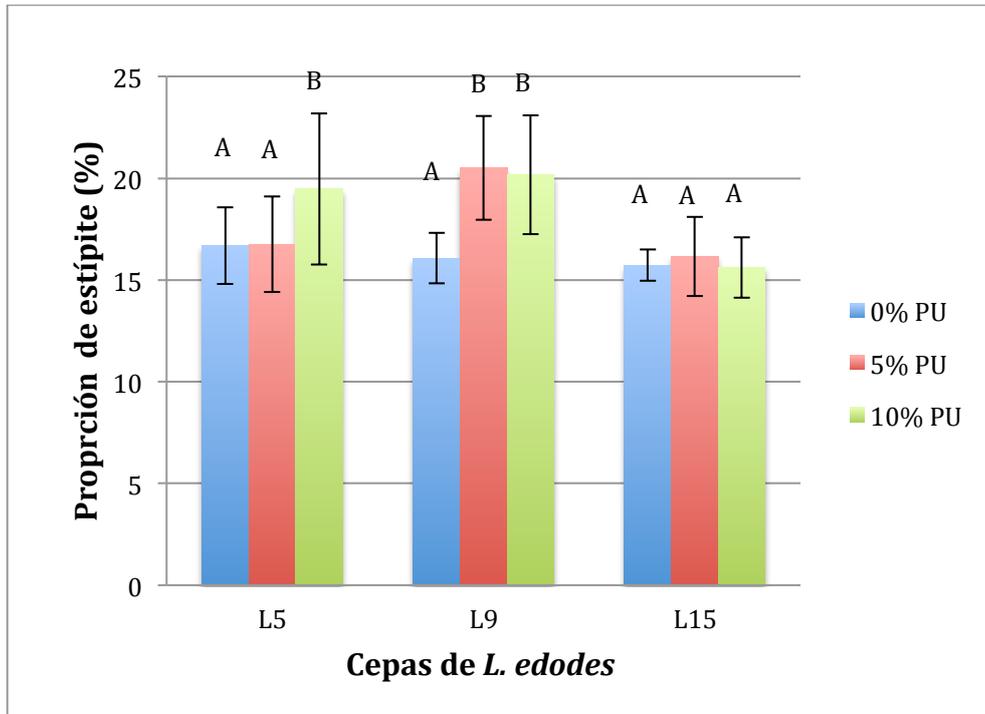


Figura. 4.18. Proporción de estípites (%) en esporóforos de 3 cepas de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.

La Figura 4.19 presenta los resultados de peso promedio de los hongos (g) para las cepas; L5, L9 y L15 de *L. edodes* en los tres diferentes sustratos (0, 5 y 10% de ePE-PU). Es de hacer notar que la cepa L9 produjo los esporóforos más pequeños (8.9 a 9.4 g) sin observarse ningún efecto debido a la proporción de ePE-PU presente en el sustrato. La cepa L5, produjo hongos significativamente más pesados (18.5 g) en el sustrato con 5% de ePE-PU, que en el sustrato control (14.1 g) y el sustrato con 10% de ePE-PU (10.6 g). Finalmente con la cepa L15 se observó un incremento significativo en el peso de los hongos obtenidos en el sustrato control (11.8 g) al usar 5% de ePE-PU (17.2 g) y 10% ePE-PU (25 g) (ver Anexo 2, Tablas 2.25 y 2.26).

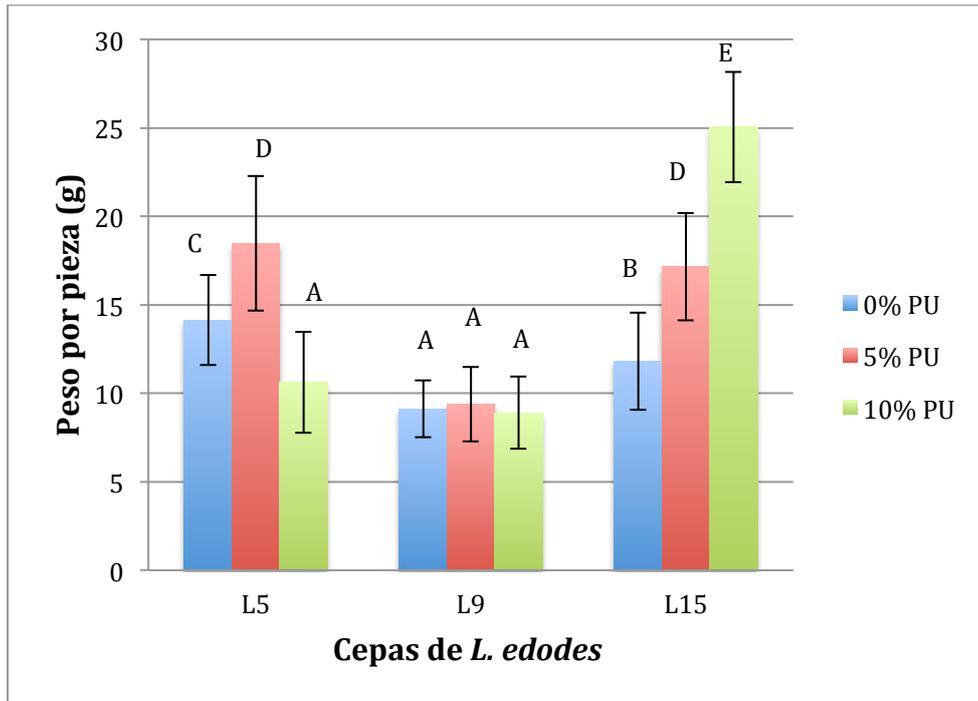


Figura 4.19. Peso promedio de esporóforos (g por pieza) de 3 cepas de *L. edodes* en sustratos ePE-PU.

5. DISCUSIÓN

Como lo expresan Chen (2005) y Miles & Chang (1997) el crecimiento micelial y la producción de esporóforos de *L. edodes* depende de diferentes factores tales como la cepa, temperatura, luz, oxígeno, humedad y disponibilidad de nutrientes. En los dos experimentos realizados se varió la disponibilidad de nutrientes, dejando los otros factores constantes para poder estudiar el efecto de la utilización de ePE-PU en el cultivo de diferentes cepas de *L. edodes*.

- En el primer experimento, se evaluó la pérdida de peso de ePE-PU causado por el crecimiento micelial en dos distintos medios de cultivo líquidos a diferentes concentraciones
- En un segundo experimento, se evaluó la producción de cuerpos fructíferos al sustituir parte del sustrato empleado regularmente por ePE-PU.

Los resultados del primer experimento mostraron un efecto bioestimulante. Cosgrove *et al.* (2010) describen que la bioestimulación consiste en aumentar la capacidad de degradación de un contaminante adicionando componentes que aporten nutrientes que faciliten el desarrollo del organismo capaz de degradarlo. La bioestimulación se ha utilizado en diversos estudios en la degradación de diversos compuestos contaminantes. En estos primeros experimentos que se realizaron en esta investigación, la adición de medios líquidos a distintas concentraciones permitió estudiar el efecto de bioestimulación en la pérdida de peso de la espuma generado por el crecimiento micelial de *L. edodes*. Se observó un marcado efecto de bioestimulación ya que las 5 cepas de *L. edodes* (L5, L9, L10 L15 y L21) generaron una mayor pérdida de peso en las espumas que estaban en los medios con mayores concentraciones de nutrientes, tanto en el medio de extracto de malta, como en el de papa dextrosa.

La adición de los medios líquidos a las espumas fue estrictamente necesaria en nuestro experimento ya que si bien se ha reportado que ciertos hongos filamentosos tienen la capacidad de degradar PU y utilizarlo como fuente de carbono (Loredo-Treviño *et al.*, 2011), los requerimientos de *L. edodes* pueden llegar a ser tan complejos que incluso se requiere de la presencia de micronutrientes como la vitamina B1 en el sustrato para su desarrollo (Chen, 2005). Este y otros componentes encontrados habitualmente en su ambiente natural y en los medios de

cultivo normalmente utilizados, no se encuentran en la ePE-PU y están presentes en los medios líquidos utilizados (papa dextrosa y extracto de malta).

Las pérdidas de peso obtenidas en el primer experimento en la ePE-PU por las 5 cepas evaluadas de *L. edodes* fueron bajas (la máxima de 14.2% para la cepa L9 en el medio PD al 50%), si se les compara con los valores de pérdida de peso reportados por Álvarez Barragán (2013) quien encontró pérdidas de peso de hasta 50% para la misma espuma, al utilizar hongos filamentosos (*Cladosporium* sp.) aislados del ambiente y caracterizados como degradadores de PU en un período de incubación de 21 días, menor al tiempo utilizado en este experimento (30 días de incubación). No obstante, estudios de este tipo, en donde hongos basidiomicetos sean utilizados para la degradación de PU no han sido reportados, siendo éste el primer trabajo en esta área.

Ahora bien, la pérdida de peso generada en las espumas por el crecimiento micelial de *L. edodes* puede deberse a diversos factores, tales como: que el crecimiento del micelio cause rupturas en la espuma por un efecto meramente mecánico; pérdida de la integridad de la espuma por generación de fragmentos producidos por ataques de las enzimas de *L. edodes* a regiones específicas de la espuma, que con el tratamiento de lavado se pierden en el sobrenadante; que parte de la espuma sea degradada a monómeros que son utilizados en el metabolismo del hongo. Y por último un efecto conjunto de los tres factores descritos anteriores. Cangemi *et al.* (2008) explican que el ataque microbiano a los polímeros puede darse de tres formas: daño biofísico por efecto del crecimiento celular; efecto bioquímico en el cual se producen sustancias que afectan la constitución del PU y la acción directa de enzimas sobre la estructura molecular, González-Hernández (2015) ha encontrado evidencias del efecto de enzimas que actúan sobre la estructura molecular del PU.

En el segundo experimento se evaluó la producción de esporóforos de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU. Las eficiencias biológicas obtenidas en este experimento en los controles sin ePE-PU para los esporóforos con estípite (L5 = 77%, L9 = 70% y L15 = 65%). Para la cepa L5 nuestra eficiencia biológica fue mayor al compararla con los valores reportados por Mireles y López (2005) de 36% y similares a la

obtenida por ellos para la cepa L9 de 77%. Comparadas con el trabajo de Sánchez (2010) las eficiencias biológicas obtenidas en este experimento resultan similares en el caso de la cepa L5 de 70% e inferiores a las que obtuvo para la cepa L9 de 89%. Por otro lado para las tres cepas (L5, L9 y L15) la eficiencia biológica fue menor si se les compara con los experimentos de Curriel Pérez (2012) en el que se obtuvieron eficiencias biológicas de 168, 178 y 156%, respectivamente. Dado que los trabajos anteriores a éste se enfocaron en aumentar las eficiencias biológicas, en ninguno de éstos se tienen resultados cuantitativos del peso promedio o la proporción de estípites.

En este experimento la eficiencia biológica obtenida al rendimiento máximo significativo (RMS) mostró que la sustitución del 5% del sustrato habitual de *L. edodes* por ePE-PU no produjo una disminución en la eficiencia biológica en ninguna de las tres cepas. Para las cepas L5 y L9 la eficiencia biológica fue similar a la de sus controles, mientras que para la cepa L15 la eficiencia fue significativamente mayor a la de su control. En los sustratos suplementados con 10% de ePE-PU las eficiencias biológicas de las cepas L5 y L9 fueron significativamente menores que sus controles y que los sustratos con 5% de ePE-PU, mientras que con la cepa L15 la eficiencia fue significativamente mayor a su control e igual que el sustrato con 5% de ePE-PU. Es decir, para las cepas L5 y L9 la sustitución con 10% de ePE-PU produjo una disminución en la eficiencia biológica, mientras que para la cepa L15 se produjo un efecto positivo, aumentando la eficiencia biológica.

En el primer brote, que es el de mayor aporte a la eficiencia biológica total y fue donde el crecimiento de los hongos fue más rápido (producen cuerpos fructíferos completamente desarrollados en períodos de una a dos semanas aproximadamente), la eficiencia biológica presentó un comportamiento distinto al de la eficiencia biológica total. Sólo para la cepa L5 en el sustrato con 10% de ePE-PU la eficiencia biológica fue menor que en los otros sustratos (5 y 0% de ePE-PU), tendencia similar a la eficiencia biológica total. Para la cepa L9, los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU produjeron una eficiencia biológica significativamente mayor que en el sustrato control. Para la cepa L15 la eficiencia biológica fue similar en los sustratos con 0 y con 5% de ePE-PU, pero menores a la obtenida para el sustrato

con 10% de ePE-PU. En otras palabras, para las cepas L9 y L15 la adición de ePE-PU tuvo un efecto benéfico pues produjeron altas eficiencias biológica en tiempos cortos, fenómeno no observado para la cepa L5.

Con respecto a la proporción de estípites, la ePE-PU causó efectos distintos. Para la cepa L5, la sustitución de 5% del sustrato con espuma no produjo diferencia respecto al control, mientras que la sustitución con 10% produjo una mayor proporción del estípites. Para la cepa L9 la sustitución del 5 y 10% del sustrato por ePE-PU causó un aumento en la proporción de estípites con respecto al control. Para la cepa L15 la sustitución de 5 y 10% del sustrato por ePE-PU no produjo un efecto en la proporción de estípites.

En el peso promedio de los hongos también se observaron diferentes efectos. Para la cepa L5 la sustitución del 5% del sustrato por ePE-PU produjo un incremento en el peso de los hongos respecto al control, mientras que la sustitución en 10% del sustrato por ePE-PU produjo hongos menos pesados (más pequeños) que el control. Para la cepa L9 la sustitución del sustrato por 5 y 10% de ePE-PU no tuvo un efecto en el peso promedio respecto al control. Para la cepa L15, la sustitución del sustrato por ePE-PU causó un aumento en el peso promedio, efecto observado en mayor grado en el sustrato con 10% de ePE-PU y en menor grado en el sustrato con 5%, pero en ambos sustratos se produjeron hongos más pesados (más grandes) que en el sustrato control.

Si bien la sustitución de sólo el 5 y el 10% del sustrato por la ePE-PU parecería de poca importancia, diversos autores reportan la estrecha correlación que existe entre los componentes de un sustrato y la eficiencia biológica obtenida en éstos (Royse *et al.*, 1986). Moonmoon *et al.* (2011) realizaron un experimento en donde el sustrato para la fructificación de *L. edodes* a base de aserrín se suplementó con salvado de trigo, salvado de arroz y harina de maíz en 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40%, y evaluaron la eficiencia biológica, calidad y crecimiento de los hongos. En el estudio se obtuvieron valores de eficiencia biológica similares a los obtenidos en este experimento (de hasta 70%) para los mejores sustratos (con 25% de suplementación). Los resultados mostraron que un incremento de tan sólo 5% en el grado de sustitución de los sustratos produjo, en la mayoría de los casos, cambios

significativos en los valores de eficiencia biológica. Es decir la eficiencia biológica puede mostrar respuesta a modificaciones de tan sólo 5% de un componente en el sustrato.

Como se observa en los resultados, aparentemente existe una relación entre la pérdida de peso en las ePE-PU generada por el crecimiento micelial de una cepa determinada de *L. edodes* y la capacidad de esa misma cepa para fructificar en medios con mayores proporciones de ePE-PU, sin producir diferencia en la eficiencia biológica respecto al control sin ePE-PU. En el caso de la cepa L5 que produjo una pérdida de peso de 9.2%, la diferencia en la eficiencia biológica entre el sustrato control y con 10% de ePE-PU fue 21% menor, mientras que para las cepas L9 y L15 que produjeron pérdidas de peso de 14.2 y 13.6% respectivamente, la diferencia entre los sustratos con 0 y 10% de ePE-PU fue 11% menor y 6% mayor. Es decir, las cepas que produjeron una mayor pérdida de peso en las espumas, en el experimento en medio líquido, su eficiencia biológica en los sustratos con ePE-PU fue similar al sustrato control sin ePE-PU.

Si bien en ambos experimentos (crecimiento micelial y producción de esporóforos) se pretende evaluar la degradación de las ePE-PU, ninguno lo hace de manera directa pues los resultados obtenidos no incluyen un análisis directo a la estructura molecular de las espumas o la identificación de algún metabolito generado por la biodegradación de las mismas. Como alguno autores reportan degradación de poliuretano usando medidas indirectas como Álvarez Barragán (2013), quién reportó pérdidas de peso en espumas de PU, Wales & Sagar (1988) reportaron cambios en las propiedades mecánicas del PU (pérdida de fuerza tensil) o Hincapié & Ramírez (2009) quienes utilizaron ensayos de respirometría en la degradación de espumas de PU; Nosotros podríamos estar hablando de degradación de la ePU-PU debido a que en este experimento se encontró una pérdida de peso en las espumas y cambios en las propiedades mecánicas en forma y resistencia respecto a espumas no tratadas (efectos no cuantificados).

La pérdida de peso en las espumas y el crecimiento de cuerpos fructíferos en sustratos con ePE-PU podría deberse a una degradación en la ePE-PU sustentado en el hecho de que *L. edodes* produce una gran cantidad de enzimas oxidativas

degradadoras inespecíficas que pueden actuar sobre algunos contaminantes (Gandofi *et al.*, 2004). Se ha reportado una producción importante de enzimas Lacasas (Hatvani & Mécs, 2001; Kurose *et al.*, 2014), y en estudios de Loredotreviño *et al.* (2011) se les ha propuesto a las lacasas como enzimas posiblemente involucrada en la degradación de poliuretano. También se ha reportado la producción de esterases por *L. edodes* (Itävaara, 1988), enzimas que se encontraron aún más implicadas en la degradación de poliuretano (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007). Por otro lado, las enzimas que producen estos hongos han reportado tener dominios hidrófobos para poder acoplarse a sus sustratos de naturaleza hidrófoba, como la lignina y la celulosa, y se ha reportado que las enzimas que tiene mejor actividad de degradación de poliuretano presentan esta característica (Howard, 2002).

Otros resultados que nos sugieren la degradación de la ePE-PU por *L. edodes* son una serie de fotografías obtenidas durante el desarrollo de esta investigación en las que se observa el crecimiento de esporóforos sobre cubos de ePE-PU (Figura 4.1) y fotografías al microscopio en las que se observa crecimiento micelial en las fibras de ePE-PU y lo que podría ser un adelgazamiento o ruptura de éstas, comparadas con fotografías de las fibras sin crecimiento de micelio (Figuras 4.2), estas fotos comparten cierta similitud con las obtenidas por González-Hernández (2015), fotos de microscopía electrónica en donde se observa adelgazamiento y formación de poros en fibras de espumas de poliuretano degradadas por hongos filamentosos. Además se observa en las fotos y durante el experimento una clara adherencia del micelio de *L. edodes* y del estípite de los esporóforos a la superficie de los cubos de ePE-PU lo que demuestra afinidad del micelio por la espuma.



Sustrato con 10% de ePE-PU invadido por micelio de cepa L5.



Esporóforos de la cepa L9 de *L. edodes* en sustrato con 5% de ePE-PU



Esporóforos de la cepa L15 de *L. edodes* extraídos de sustrato con 10% de ePE-PU

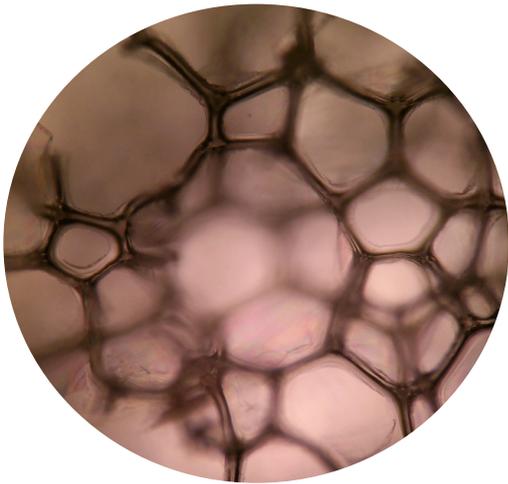


Cubo de ePE-PU incrustado en el estípite de la cepa L9 de *L. edodes* en sustrato con 5% de ePE-PU

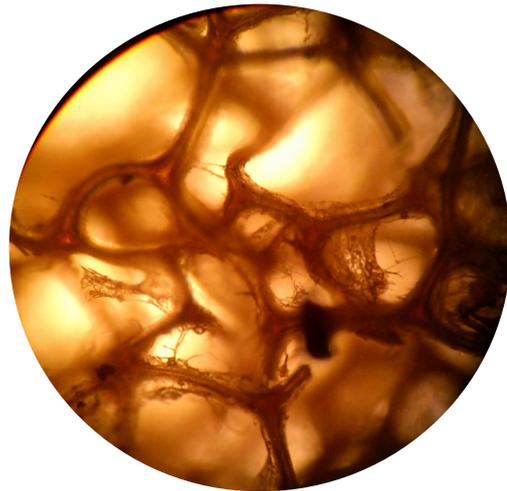
Figura 4.1. Crecimiento de esporóforos de diferentes cepas de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU.



Micelio de cepa L 15 de *L. edodes* en caja con medio AEM después de 5 días de incubación (microscopía 16x)



Fibras de ePE-PU antes de ser incorporadas al sustrato (microscopía 16x)



Micelio de cepa L15 de *L. edodes* creciendo sobre fibras de ePE-PU (microscopía 16x)



Fibras de ePE-PU antes de ser incorporadas al sustrato (microscopía 40x)



Micelio de cepa L15 de *L. edodes* creciendo sobre fibra de ePE-PU (microscopía 40x)

Figura 4.2. Crecimiento micelial de cepa L15 de *L. edodes* sobre ePE-PU

CONCLUSIONES.

- Las 5 cepas de *L. edodes* (L5, L9, L10, L15 y L21) evaluadas en medios líquidos fueron capaces de causar una pérdida de peso en las ePE-PU en todos los medios evaluados.
- Para las 5 cepas de *L. edodes* cultivadas en medios líquidos con ePE-PU, las mayores pérdidas de peso se obtuvieron al utilizar el medio PD al 50%.
- Las tres cepas de *L. edodes* (L5, L9, y L15) que se llevaron a fructificación tuvieron la capacidad de invadir y fructificar en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU.
- Para la cepa L5 la mayor eficiencia biológica y menor proporción de estípites se obtuvo en los sustratos control y con 5% de ePE-PU. El sustrato con 5% de ePE-PU produjo los hongos más grandes.
- Para la cepa L9 la mayor eficiencia biológica se obtuvo en los sustratos control y con 5% de ePE-PU. Los sustratos con ePE-PU produjeron hongos con más estípites y el peso de los hongos fue el mismo en los tres sustratos.
- Para la cepa L15, la mayor eficiencia biológica se obtuvo en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU. La proporción de estípites fue la misma en los hongos de los tres sustratos y los hongos más pesados se obtuvieron en el sustrato con 5% de ePE-PU.
- Dado que en ambos experimentos, la ePE-PU no fue inerte al crecimiento de *L. edodes* y debido a que se observaron fenómenos diversos en la interacción entre la espuma y el hongo es probable que *L. edodes* tenga la capacidad de degradar ePE-PU.

7. RECOMENDACIONES

- Para evaluar el efecto de incorporar una mayor proporción de espuma en el sustrato, es recomendable utilizar piezas más pequeñas de ePE-PU o triturar hasta hacer polvo de ePE-PU, para lograr una mayor homogeneidad del sustrato y la menor diferencia posible en el tamaño de los sustratos. Lo anterior permitiría evaluar una mayor sustitución de la ePE-PU en el sustrato.
- Debido a que en los experimentos realizados en este trabajo no permiten evaluar de manera directa la degradación de la ePE-PU, pero si se encontraron resultados que sugieren fuertemente la degradación de la ePE-PU por *L. edodes*, se recomienda hacer uso de técnicas que permitan evaluar de manera directa la degradación de la ePE-PU a nivel microscópico y molecular. Técnicas como microscopía electrónica de barrido o análisis de resonancia magnética nuclear de la espuma serían de gran utilidad para ello. Aunado a la identificación de actividades enzimáticas durante el crecimiento del hongo sobre la espuma.
- Sería interesante evaluar con este mismo modelo experimental otros hongos basidiomicetos altamente degradadores y su interacción con la ePE-PU, así como con otras espumas de poliuretano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, Bisby (2001). *Dictionary of the fungi* (9th ed), CABI Bioscience, New York, NY
- Alavi-Nikje, M. M., A. Bagheri-Garmarudi, B. A. Idris (2011). Polyurethane waste reduction and recycling: from bench to pilot scales. *Des Monomers Polym.* 14: 395 - 421.
- Álvarez Barragán, J., (2013). *Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis experimental.* Facultad de Química, UNAM.
- Andrade, G. R., G. Mata, J. Sánchez, (2012). La producción Iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. *En: Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica.* Eds. Mata, G., Sánchez J. 9 - 15.
- Aoki, T., (1984). Lentinan: Immune modulation agents and their mechanisms. *Inmunol. Stud.* 25: 62 - 77.
- Barrat, S. R., A. R. Ennos, G. D. Robson, P. S. Handly, (2003). Fungi are the predominant microorganisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over range of soil water holding capacities. *J. Appl. Microbiol.* 96: 78 - 85.
- Cangemi, J. M., A. Dos Santos, S. C. Neto, G. O. Chierice, (2008). Biodegradation of polyurethane derivative from castor oil. *Polimeros: Ciência e Tecnologia.* 18: 201 - 206.
- Chang, S. T., W. A. Hayes, (1978). *The biology and cultivation of edible mushroom.* Academic Press, New York, NY.
- Chang, S. T., P. G. Miles, (2004). *Mushroom: Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact.* 2th ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Chen, G. Q., G. M. Zeng, G. H. Huang, Y. N. Chen, (2005). A novel bio-sorbent: characterization of the spent mushroom and their compost and its application for removal of heavy metals. *J. Environ. Sci.* 17: 756 - 760.
- Chen, W. A., (2005). What is Shiitake? *In: Mushroom Growers' Handbook 2.* Mush. World, Seoul, Korea 1 - 11.
- Chia-Wei, P., S. Vikineswary, (2012). Potential use of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Appl. Microbiol. Biot.* 96: 863 - 873.

- Chihara, G., J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka, (1970). Fractionation and purification of the polysaccharides whit market anti tumor activity, especially lentinana from *Lentinula edodes* (Berk) sing. (and edible mushroom) *Cancer Res.* 30: 2776 - 2781.
- Cosgrove, L., P. L. Mc Geechean, P. S. Handley, G.D. Robson, (2010). Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Appl. Environ. Microb.* 76: 810 - 819
- Cudris, G.M., (2011). *Caracterización de la microbiota contaminante del cultivo de Lentinula edodes (Shiitake) en diferentes residuos agroforestales.* Tesis para obtener el grado de M. en C. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Curiel Pérez, L. P., (2012). *Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de 3 cepas de Lentinula edodes (shiitake).* Tesis experimental Facultad de Química, UNAM.
- Eweis, J. B., S. J. Ergas, D. P. Chang, E. D. Schroeder, (1999). *Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos.* Mc Graw-Hill, Madrid.
- Gandofi, C. B., L. Obici, M. C. Giatti, M.R. Peralta, (2004). Decolorization of synthetic dyes by solid-state cultures of *Lentinula edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technol.* 94: 107 - 112.
- González-Hernández R. (2015) Comunicación personal estudiante de maestría, Facultad de Química, UNAM
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salomones, C. Soto, L. Guzmán., (2002). *El Cultivo de hongos comestibles* 1ª ed IPN México D. F. 5 - 25.
- Hatvati, N., I. Mécs, (2001). Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containig by-product of the brewing process. *Process Biochem.* 37: 491 – 496.
- Hatvati, N., I. Mécs, (2002). Effect of the nutrient composition on dye depolarization and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microbial Tech.* 30: 381 - 386.
- Hincapié, L. A., C. E. Ramírez, (2009). Evaluación de la degradación aerobia de poliuretano residual en la industria de fabricación de refrigeradores. *Rev. Invest. Aplic.* 5: 15 - 25.
- Howard, T. G., (2002). Biodegradation of polyurethane: a review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 49: 245 - 252.

- Itävaara, M., (1988) Identification of shiitake strains and some other basidiomycetes: protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms as an aid in taxonomy, *T. Brit. Mycol. Soc.* 91: 295 - 304.
- Kawai, F., (1995), Breakdown of plastics and polymers by microorganism. *Adv. Biochem. Eng. and Biotechnol.* 52: 151 - 194.
- Kurose, T., Y. Saito, K. Kimata, Y. Nakagawa, A. Yano, K. Ito, Y. Kawarasaki, (2014). Secretory expression of *Lentinula edodes* intracellular laccase by yeast high-cell-density system: Sub-milligram production of difficult-to-express secretory protein. *J. Biosci. and Bioeng.* 117 (6): 659 – 663.
- Kwon, H., C. H. Hobbs, (2005). Nutritional and medical values of shiitake, *In: Mushroom Growers' Handbook 2*. Mush. World Seoul, Korea 12 - 22.
- Lasota, W., J. Sylwestrzak, (1989). Chemical composition of cultivated mushrooms. Part III. Shiitake *Lentinula edodes* (Berk) Sing. *Bromatol. Chem. Toksykol* 22: 167 - 171.
- Loredó-Treviño, A., G. García, A. Velásquez-Téllez, R. Rodríguez-Herrera, C. Aguilar, (2011). Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Adv. Biosci. Biotech.* 2: 52 - 58.
- Lui, B., Y. Y. S. Bau, (1980). *Fungo Pharmacopoeia*. Kinoko Press, Oakland, California.
- Martínez-Carrera, D., (2002). Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* 14 (2): 61 - 74.
- Miles, P. G., S. T. Chang, (1997). *Mushroom Biology. Conscience Basic and Current Development*. World Scientific, Danvers, Massachusetts.
- Mireles, P. C., E. López, (2005). *Evaluación de la producción del hongo comestible Lentinula edodes (shiitake) en sustratos de aserrín con suplementos. Tesis experimental*. Facultad de Química, UNAM.
- Montgomery, D. C., (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa Wiley México D.F.
- Moonmoon, M., S. N. Jahan, M. K. Asaduzzaman, U. M. Nazim, K. Hossain, M. Tania, S. Ahmed, (2011). Effects of different levels of wheat bran, rice bran and maize powder supplementation with sawdust on the production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) singer). *Saudi J. Biol. Sci.* 18: 323 - 328.
- Ocegüera-Cervantes, A., A. Carrillo-García, N. López, S. Bolaños-Núñez, M. J. Cruz-Gómez, C. Wachter, and H. Loza-Tavera., (2007). Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and *N*-methylpyrrolidone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6214 - 6223.

- Pérez, R. M., (2010). *Degradación enzimática de espuma de poliuretano de desecho. Tesis experimental*. Facultad de Química, UNAM.
- Ren, X., (2003). Biodegradable plastics: a solution or a challenge? *J. Clean Prod.* 11: 27, 40.
- Royse, D.J., C.C. Bahler, (1986). Effect of genotype, spawn run time, and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. *Appl. Environ. Microb.* 52: 1425 - 1427.
- Royse, D. J., (2001). Cultivation of shiitake on natural and synthetic logs. *College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension, Pennsylvania State University*. University Park, Pennsylvania.
- Ramírez, R, H. Leal, (2001-2003). El rendimiento máximo significativo para el análisis estadístico de la producción de *Lentinula edodes* en sustrato comercial de aserrín. *Rev. Mex. Micol.* 17: 7 - 10.
- Sánchez, M., (2010). *Evaluación de diferentes sustratos sobre la producción de Lentinula edodes. Tesis experimental*. Facultad de Química, UNAM.
- Seo, J. S., Y. S. Keum, O. X. Li, (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res.* 6: 278 - 279.
- Shah, A. A., F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 26: 278 - 279.
- Shah, M. M., D. P. Barr, N. Chung, S. D. Aust, (1992) Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemical, *Toxicol. Lett.* 64 – 65: 493 – 501.
- Stamets, P., (2000). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley, California, 259 - 276.
- Stamets, P., J. S. Chilton, (1983) *The Mushroom cultivator: A practical guide to growing mushrooms at home*. Agarikon Press, Olympia, Washington.
- Urbanski, J., W. Czerwinski, K., Janicka, F. Majewska, H. Zowall, (1997). *Handbook of analysis of synthetic polymers and lastics*. Halsted Press, New York, N.Y.
- Wales, D. S., B. R. Sagar, (1988) Mechanistic aspects of polyurethane biodeterioration. *In: Biodegradation*. Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins H.O.W. (Eds.), 7th Edition. Elsevier Applied Science, London U. K. 351 - 358.
- Winding, D. G., C. C. Hiatt, (1961). *Polymeric material*. Mc Graw-Hill, New York, N. Y., 271 - 275.
- Woods G., (2001). *The ici polyurethanes book*. John Wiley and Sons, Ann Arbor, Michigan, 1-6, 27 - 8.
- Yamamura, Y., K. W. Cochran, (1974). Chorionic hypo cholesterolemic effect of *Lentinula edodes* in mice and absence of effect on scrape. *Mushroom Science* (part 1). Mushroom Research Institute, Kiryu, Japan 489 - 493.

ANEXOS 1

Tablas de resultados de producción de esporóforos en sustratos con ePE-PU

Tabla 1.1. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **con estípite** de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	60.1 ± 4.0	3.0 ± 4.4	13.6 ± 5.8	76.9 ± 4.4
5	55.4 ± 6.0	10.2 ± 3.6	9.9 ± 2.8	75.4 ± 7.6
10	52.6 ± 5.8	1.3 ± 2.8	6.9 ± 6.8	60.7 ± 7.7

Tabla 1.2. Eficiencia biológica acumulada por brotes de hongos **con estípite** de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)		
	Brotes		
	1	2	3
0%	60.1 ± 4.0	63.1 ± 3.5	76.9 ± 4.4
5%	55.4 ± 6.0	65.6 ± 8.3	75.4 ± 7.6
10%	52.6 ± 5.8	53.8 ± 4.9	60.7 ± 7.7

Tabla 1.3. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **sin estípite** de cepa L5 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco sin estípite /100g sustrato seco)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	48.9 ± 4.4	2.7 ± 3.9	12.2 ± 4.9	63.8 ± 3.8
5	45.0 ± 3.3	9.2 ± 3.2	8.8 ± 2.4	62.9 ± 6.6
10	42.7 ± 2.9	1.1 ± 2.4	6.0 ± 6.0	49.8 ± 5.8

Tabla 1.4. Proporción de estípite en hongos de cepa L5 de *L. edodes* por brote y total en sustratos con ePE-PU (proporción del estípite respecto a todo el cuerpo fructífero)

Contenido de ePE-PU (%)	Proporción de estípite de hongos (%)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	19.6 ± 3.7	11.9 ± 2.0	11.5 ± 3.2	16.7 ± 1.9
5	18.0 ± 4.4	9.3 ± 2.7	10.6 ± 2.2	16.8 ± 2.3
10	20.0 ± 5.0	13.1 ± 3.3	13.5 ± 3.6	19.5 ± 3.7

Tabla 1.5. Peso promedio de esporóforos de cepa L5 por brote y total en sustratos con ePE-PU (g / pieza)

Contenido de ePE-PU (%)	Peso promedio de hongos (g)			
	Brotos			TOTAL
	1	2	3	
0	9.2 ± 3.9	10.3 ± 1.7	16.9 ± 3.6	14.1 ± 2.5
5	16.0 ± 9.5	20.5 ± 6.5	20.8 ± 8.8	18.5 ± 3.8
10	10.7 ± 5.1	14.8 ± 3.4	11.6 ± 2.3	10.6 ± 2.9

Tabla 1.6. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **con estípites** de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípites /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco con estípites /100 g sustrato seco)			
	Brotos			TOTAL
	1	2	3	
0	48.6 ± 4.2	12.6 ± 4.9	10.8 ± 4.4	70.4 ± 6.0
5	67.4 ± 15.7	7.7 ± 7.9	7.7 ± 6.4	82.1 ± 10.3
10	62.9 ± 9.3	3.6 ± 4.7	2.3 ± 3.7	68.7 ± 9.3

Tabla 1.7. Eficiencia biológica acumulada por brotes de hongos **con estípite** de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)		
	Brotes		
	1	2	3
0	48.6 ± 4.2	59.6 ± 9.1	70.4 ± 6.0
5	67.4 ± 15.7	74.5 ± 14.2	82.1 ± 10.3
10	62.9 ± 9.3	66.5 ± 10.6	68.7 ± 9.3

Tabla 1.8. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **sin estípite** de cepa L9 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco sin estípite /100 g sustrato seco)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	39.0 ± 4.8	11.1 ± 4.3	9.4 ± 4.4	59.4 ± 4.9
5	51.0 ± 3.1	6.2 ± 6.9	6.8 ± 5.6	64.0 ± 5.4
10	50.0 ± 6.1	3.1 ± 4.1	2.0 ± 3.3	55.2 ± 6.3

Tabla 1.9. Proporción de estípite en hongos de cepa L9 *L. edodes* por brote y total en sustratos con ePE-PU (proporción del estípite respecto a todo el cuerpo fructífero)

Contenido de ePE-PU (%)	Proporción de estípite de hongos (%)			
	Brotos			TOTAL
	1	2	3	
0	17.1 ± 1.2	11.8 ± 3.1	15.0 ± 9.4	16.1 ± 1.2
5	23.0 ± 4.2	10.0 ± 3.5	11.7 ± 2.2	20.5 ± 2.6
10	20.6 ± 4.2	11.9 ± 6.5	9.8 ± 0.8	20.2 ± 2.9

Tabla 1.10. Peso promedio de esporóforos de cepa L9 por brote y total en sustratos con ePE-PU (g / pieza)

Contenido de ePE-PU (%)	Peso promedio de hongos (g)			
	Brotos			TOTAL
	1	2	3	
0	6.3 ± 1.3	8.2 ± 6.0	14.8 ± 6.1	9.1 ± 1.6
5	5.8 ± 1.4	12.0 ± 4.5	18.1 ± 6.2	9.4 ± 2.1
10	6.0 ± 2.0	11.9 ± 4.2	29.3 ± 21.1	8.9 ± 2.0

Tabla 1.11. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **con estípite** de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	41.9 ± 2.8	13.3 ± 4.2	9.8 ± 5.6	64.9 ± 5.6
5	45.8 ± 9.1	11.7 ± 4.1	12.8 ± 8.0	70.3 ± 8.5
10	46.2 ± 2.0	7.9 ± 9.2	13.2 ± 5.3	67.4 ± 13.3

Tabla 1.12. Eficiencia biológica acumulada por brotes de hongos **con estípite** de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica acumulada (g hongo fresco con estípite /100 g sustrato seco)		
	Brotes		
	1	2	3
0	41.9 ± 2.8	55.2 ± 4.1	64.9 ± 5.6
5	45.8 ± 9.1	57.5 ± 11.4	70.3 ± 8.5
10	46.2 ± 2.0	54.1 ± 10.8	67.4 ± 13.3

Tabla 1.13. Eficiencia biológica por brotes y total de hongos **sin estípites** de cepa L15 de *L. edodes* en sustratos con ePE-PU (g hongo fresco **sin estípites** /100 g sustrato seco)

Contenido de ePE-PU (%)	Eficiencia biológica (g hongo fresco sin estípites /100 g sustrato seco)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	35.4 ± 3.1	11.4 ± 4.0	8.0 ± 4.5	54.8 ± 4.8
5	36.0 ± 3.5	9.8 ± 3.7	10.8 ± 6.7	56.6 ± 1.9
10	39.9 ± 2.8	7.0 ± 8.1	11.2 ± 4.6	58.1 ± 8.7

Tabla 1.14. Proporción de estípites en hongos de cepa L15 *L. edodes* por brote y total en sustratos con ePE-PU (proporción del estípites respecto a todo el cuerpo fructífero)

Contenido de ePE-PU (%)	Proporción de estípites de hongos (%)			
	Brotes			TOTAL
	1	2	3	
0	16.7 ± 3.7	14.5 ± 4.6	16.8 ± 6.4	15.7 ± 0.8
5	20.6 ± 9.9	16.8 ± 3.8	16.0 ± 1.7	16.2 ± 1.9
10	16.7 ± 8.6	10.8 ± 5.8	15.5 ± 1.8	15.6 ± 1.5

Tabla 1.15. Peso promedio de esporóforos de cepa L5 por brote y total en sustratos con ePE-PU (g / pieza)

Contenido de ePE-PU (%)	Peso promedio de hongos (g)			
	Brotos			TOTAL
	1	2	3	
0	9.1 ± 3.9	16.3 ± 9.6	7.9 ± 4.4	11.8 ± 2.7
5	11.3 ± 3.3	21.4 ± 10.3	15.8 ± 8.1	17.2 ± 3.0
10	19.7 ± 8.5	32.1 ± 11.1	21.1 ± 5.8	25.0 ± 3.1

Anexo 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para identificar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS) se realizó un análisis de varianza para cada una de las cepas y cada nivel de ePE-PU. Si como resultado del análisis de varianza se encontraron diferencias significativas o altamente significativas en los brotes a continuación se realizó la prueba de Duncan para determinar el brote donde se obtuvo la mayor eficiencia biológica estadísticamente significativa. En los casos donde la variable de réplicas presentó diferencia significativa o altamente significativa es recomendable que en experimentos posteriores se incremente el número de las replicas, para dar mayor validez estadística a los resultados.

Cepa L5

En la Tabla 2.1 se observa que existe diferencia altamente significativa para la variable brotes y no existe diferencia significativa para la variable réplica por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote en donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.1. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L5 en el sustrato control con 0% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	632.68	2	316.34	39.57	4.46 8.65	**	
Réplicas	121.71	4	30.43	3.81	3.84 7.00	NS	
Error	63.95	8	7.99				
Total	818.34	14					

NS No existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la Tabla 2.2 se observa que el paquete estadístico reportó 2 grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a y para el grupo II la letra b. Para determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se considera el primer brote del último grupo. En este caso el primero y segundo brote se ubicaron en el primer grupo, lo que indica que no hay diferencia significativa en la eficiencia biológica entre ellos, pero el brote tres se ubicó en el segundo grupo lo que indica hay diferencia significativa entre el tercer brote respecto al segundo y primero, siendo éste donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo.

Tabla 2.2. Prueba de Duncan para cepa L5 en sustrato con 0% de ePE-PU

No de brote	Grupos		Interpretación
	I	II	
Brote 1	48.9		48.9 ± 4.4 a
Brote 2	51.5		51.5 ± 3.6 a
Brote 3		63.8	63.8 ± 3.8 b

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la Tabla 2.3 se observa que existe diferencia altamente significativa para las variables brotes y réplica por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote en el que se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.3. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa la cepa L5 en el sustrato con 5% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotos	806.51	2	403.26	68.97	4.46 8.65	**	
Réplicas	326.20	4	81.55	13.95	3.84 7.00	**	
Error	46.77	8	5.85				
Total	1179.48	14					

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la Tabla 2.4 se observa que el paquete estadístico reportó 3 grupos. Cada grupo correspondió a cada brote, y a una letra distinta lo que indica fue hasta el tercer brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo, con incrementos significativos entre cada brote.

Tabla 2.4. Prueba de Duncan para cepa L5 en sustrato con 5% de ePE-PU

No de brote	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
Brote 1	45.0			45.0±3.3 a
Brote 2		54.1		54.1±6.2 b
Brote 3			62.9	62.9±6.6 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la Tabla 2.5 se observa que existe diferencia significativa en la variable brotes y no existe diferencia entre la variable réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.5. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L5 en el sustrato con 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	144.95	2	72.47	4.76	4.46 8.65	*	
Réplicas	87.32	4	21.83	1.43	3.84 7.00	NS	
Error	121.73	8	15.22				
Total	353.99	14					

NS No existe diferencia significativa

* Existe diferencia significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la Tabla 2.6 se observa que el paquete estadístico reportó 2 grupos. En este caso el primero y segundo brote se ubicaron en el primer grupo, lo que indica que no hay diferencia significativa en la eficiencia biológica entre ellos, pero el brote tres se ubicó en el segundo grupo lo que indica

hay diferencia significativa entre el tercer brote respecto al segundo y primero, siendo éste donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo

Tabla 2.6. Prueba de Duncan para cepa L5 en sustrato con 10% de ePE-PU

Brote	Grupos		Interpretación
	I	II	
Brote 1	42.7		42.7 ± 2.9 a
Brote 2	43.8		43.8 ± 3.2 a
Brote 3		49.8	49.8 ± 5.6 b

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

Capa L9

En la Tabla 2.7 se observa que existe diferencia altamente significativa para las variables brotes y réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.7 Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L9 en el sustrato control con 0% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotos	1668.61	2	834.30	81.72	3.34 6.52	**	
Replicas	593.21	7	84.74	8.30	2.76 4.28	**	
Error	142.93	14	10.21				
Total	2404.74	23					

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la Tabla 2.8 se observa que el paquete estadístico reportó 3 grupos. Cada grupo correspondió a cada brote, y a una letra distinta lo que indica que hay diferencia significativa en la eficiencia biológica entre cada brote, siendo el tercer brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo.

Tabla 2.8. Prueba Duncan para cepa L9 en sustrato con 0% de ePE-PU

No de brote	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
Brote 1	39.0			39.0 ± 4.8 a
Brote 2		50.0		50.0 ± 7.6 b
Brote 3			59.4	59.4 ± 4.9 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la Tabla 2.9 se observa que existe diferencia altamente significativa en la variable brotes y diferencia significativa en la variable réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.9. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L9 en el sustrato con 5% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	509.89	2	254.94	10.90	3.70 7.56	**	
Réplicas	626.20	5	125.24	5.36	3.33 5.64	*	
Error	233.87	10	23.39				
Total	1369.96	17					

* Existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la Tabla 2.10 se observa que el paquete estadístico reportó 3 grupos. Cada grupo correspondió a cada brote, y a una letra distinta, lo que indica que hay diferencia significativa en la eficiencia biológica entre cada brote, siendo el tercer brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo.

Tabla 2.10. Prueba Duncan para cepa L9 en sustrato con 5% de ePE-PU

No de brote	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
Brote 1	51.0			51.0 ± 8.8 a
Brote 2		57.2		57.2 ± 8.1 b
Brote 3			64.0	64.0 ± 5.4 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la Tabla 2.11 se observa que existe diferencia significativa en la variable brotes y diferencia altamente significativa en la variable réplica por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.11. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L9 en el sustrato con 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	81.22	2	40.61	6.22	3.70 7.56	*	
Réplicas	536.46	5	107.29	16.42	3.33 5.64	**	
Error	65.33	10	6.53				
Total	683.01	17					

* Existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan en la Tabla 2.12 se observa que el paquete estadístico reportó dos grupos. En este caso el primero se ubico en el primer grupo, el segundo brote se ubico en ambos grupos y el tercer brote en el segundo grupo, por lo cual se asignaron las letras a, ab y b para cada brote, respectivamente lo que indica que no hay diferencia significativa en la eficiencia biológica del primero y segundo brote ni entre el segundo y tercero. Como el mayor incremento se registro en el grupo dos, y en este grupo se ubican el segundo y tercer brote, el valor en el que se obtiene el rendimiento máximo significativo corresponde al segundo brote.

Tabla 2.12. Prueba Duncan para cepa L9 en sustrato con 10% de ePE-PU

Brote	Grupos		Interpretación
	I	II	
Brote 1	50.0		50.0 ± 6.1 a
Brote 2	53.1	53.1	53.1 ± 6.7 ab
Brote 3		55.18	55.2 ± 6.3 b

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

Cepa L15

En la Tabla 2.13 se observa que existe diferencia altamente significativa en la variable brotes y no existe diferencia en la variable réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.13. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L15 en el sustrato control con 0% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F			Interpretación
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Brotes	1142.92	2	571.46	48.94	3.70	7.56	**
Réplicas	147.10	5	29.42	2.52	3.33	5.64	NS
Error	116.78	10	11.68				
Total	1406.80	17					

NS No existe diferencia significativa

** Existe diferencia significativa

Como resultado de la prueba Duncan en la Tabla 2.14 se observa que el paquete estadístico reportó 3 grupos. Cada grupo correspondió a cada brote, y a una letra distinta lo que indica fue hasta el tercer brote donde se alcanzó el máximo rendimiento significativo, con incrementos significativos entre cada brote.

Tabla 2.14. Prueba Duncan para cepa L15 en sustrato con 0% de ePE-PU

No de brote	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
Brote 1	35.4			35.4 ± 3.1a
Brote 2		46.8		46.8 ± 4.4b
Brote 3			54.8	54.8 ± 4.8 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la Tabla 2.15 se observa que existe diferencia altamente significativa en la variable brotes y no existe diferencia en la variable réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.15. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L15 en el sustrato con 5% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	1055.67	2	527.83	40.71	4.46 8.65	**	
Réplicas	94.22	4	23.55	1.82	3.84 7.00	NS	
Error	103.71	8	12.96				
Total	1253.60	14					

NS No existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la tabla 2.16 se observa que el paquete estadístico reportó tres grupos. Cada grupo correspondió a cada brote, y a una letra distinta lo que indica que fue hasta el tercer brote donde se alcanzó el máximo rendimiento significativo, con incrementos significativos entre cada brote.

Tabla 2.16. Prueba Duncan para cepa L15 en sustrato con 5% de ePE-PU

No de brote	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
Brote 1	36.0			36.0 ± 3.5 a
Brote 2		45.8		45.8 ± 5.8 b
Brote 3			56.6	56.6 ± 1.9 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

En la tabla 2.17 se observa que existe diferencia significativa en la variable brotes y no existe diferencia en la variable réplicas por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo (RMS).

Tabla 2.17. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica acumulada durante los tres brotes de cosecha para la cepa L15 en el sustrato con 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Brotes	670.60	2	335.30	10.17	5.14 10.93	*	
Réplicas	192.45	3	64.15	1.95	4.76 6.55	NS	
Error	197.76	6	32.96				
Total	1060.82	11					

NS No existe diferencia significativa

* Existe diferencia significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la tabla 2.18 se observa que el paquete estadístico reportó dos grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a y para el grupo II la letra b. Para determinar el brote donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo se considera el primer brote del último grupo. En este caso el primero y segundo brote se ubicaron en el primer grupo, lo que indica que no hay diferencia significativa en la eficiencia biológica entre ellos, pero el brote tres se ubicó en el segundo grupo lo que indica hay diferencia significativa entre el tercer brote respecto al segundo y primero, siendo éste donde se alcanzó el rendimiento máximo significativo.

Tabla 2.18. Prueba Duncan para cepa L15 en sustrato con 10% de ePE-PU

Brote	Grupos		Interpretación
	I	II	
Brote 1	39.9		39.9 ± 2.8 a
Brote 2	46.9		46.9 ± 6.8 a
Brote 3		58.1	58.1 ± 8.7 b

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$). La fila marcada indica el brote donde se alcanzó el RMS

Comparación de eficiencia biológica al RMS de las 3 cepas y los 3 niveles de ePE-PU

En la tabla 2.19 se observa que no existe diferencia significativa en la variable cepas, para los niveles de ePE-PU si se observaron diferencias altamente significativas y para la interacción cepas x niveles de ePE-PU hubo diferencia significativa. La interacción entre las dos variables nos indica que para cada cepa hay un nivel de ePE-PU donde se obtiene la mayor eficiencia biológica al RMS por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar la cepa (s) y nivel (es) de ePE-PU donde se obtuvieron las mayores eficiencias biológicas.

Tabla 2.19. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica al RMS para las cepas L5, L9 y L15 en los sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F			Interpretación
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Cepas	57.62	2	28.81	0.94	3.23	5.18	NS
Niveles de ePE-PU	462.54	2	231.27	7.52	3.32	5.18	**
Cepas x niveles de ePE-PU	456.17	4	114.04	3.71	2.60	3.82	*
Error	1260.15	41	30.74				
Total	2334.40	49					

NS No existe diferencia significativa

* Existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la tabla 2.20 se observa que el paquete estadístico reportó 3 grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a, para el grupo II la letra b y para el grupo III la letra c. El grupo c es donde se obtienen las mayores eficiencias biológicas (L5 y L9 con 0 y 5% de ePE-PU y L15 en los sustratos con 5 y 10% de ePE-PU. En el grupo b se encuentra la cepa L9 con 10% de ePE-PU y la cepa L15 sin ePE-PU). Finalmente la menor eficiencia biológica se obtiene en el grupo con la cepa L5 con 5% de ePE-PU).

Tabla 2.20 Prueba Duncan para determinar diferencias significativas entre los valores de eficiencia al RMS de las 3 cepas de *L. edodes* y los 3 niveles de ePE-PU

Cepa y nivel de ePE-PU	Grupos			Interpretación
	I	II	III	
L5, 10%	49.8			49.8 ± 3.8 a
L9, 10%		53.1		53.1 ± 6.7 b
L15, 0%		54.8		54.8 ± 4.8 b
L15, 5%			56.6	56.6 ± 1.9 c
L15, 10%			58.1	58.1 ± 8.7 c
L9, 0%			59.4	59.4 ± 4.9 c
L5, 5%			62.9	62.9 ± 6.6 c
L5, 0%			63.8	63.8 ± 3.8 c
L9, 5%			64.0	64.0 ± 5.4 c

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$).

Comparación de eficiencia biológica al primer brote para las 3 cepas y los 3 niveles de ePE-PU

En la tabla 2.21 se observa que no existe diferencia significativa entre los 3 niveles de ePE-PU, la variable cepas presentó diferencias altamente significativas y la interacción entre las variables cepas x niveles de ePE-PU también presentó diferencias altamente significativas. La interacción entre las dos variables nos indica que para cada cepa hay un nivel de ePE-PU donde se obtiene la mayor eficiencia biológica en el primer brote por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder

determinar la cepa (s) y nivel (es) de ePE-PU donde se obtuvieron las mayores eficiencias biológicas al primer brote.

Tabla 2.21. Análisis de varianza para identificar diferencia en la eficiencia biológica al del primer brote para las cepas L5, L9 y L15 en los sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Cepas	857.75	2	428.88	17.43	3.23 5.16	**	
Niveles de ePE-PU	106.46	2	53.23	2.16	3.23 5.16	NS	
Cepas x niveles de ePE-PU	602.84	4	150.71	6.13	2.60 3.81	**	
Error	1008.56	41	24.60				
Total	2644.69	49					

NS No existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan en la tabla 2.22 se observa que el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a, al grupo II la letra b, al grupo III la letra c y para el grupo IV la letra d. En el grupo IV la cepa L5 con 0 y 5% y la cepa L9 con 5 y 10% de ePE-PU fueron las que produjeron las mayores eficiencias biológicas al primer brote.

Tabla 2.22. Prueba Duncan para determinar diferencias significativas entre los valores de eficiencia al primer brote de las 3 cepas de *L. edodes* y los 3 niveles de ePE-PU

Cepa y nivel de ePE-PU (%)	Grupos				Interpretación
	I	II	I	IV	
L15, 0	35.4				35.4 ± 3.1 a
L15, 5	36.0				36.0 ± 3.5 a
L9, 0		39.0			39.0 ± 4.8 b
L15, 10		39.9			39.9 ± 2.8 b
L5, 10			42.7		42.7 ± 2.9 c
L5, 5				45.0	45.0 ± 3.3 d
L5, 0				48.9	48.9 ± 4.4 d
L9, 10				50.0	50.0 ± 6.1 d
L9, 5				51.0	51.0 ± 3.1 d

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$).

Comparación de la proporción de estípite para las 3 cepas y los 3 niveles de ePE-PU

En la tabla 2.23 se observa diferencia altamente significativa en la proporción de estípite para las 3 cepas, mientras que para los 3 niveles de ePE-PU y la interacción cepas x niveles de ePE-PU sólo hubo diferencias significativas.

La interacción entre las dos variables nos indica que para cada cepa hay un nivel de ePE-PU donde es posible obtener una menor proporción de estípite por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar la cepa (s) y nivel (es) de ePE-PU donde se obtuvieron las menores proporciones de estípite.

Tabla 2.23. Análisis de varianza para identificar diferencia en la proporción de estípite de los hongos de las cepas L5, L9 y L15 en los sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F		Interpretación	
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05		0.01
Cepas	84.82	2	42.41	7.83	3.18 5.05	**	
Niveles de ePE-PU	52.96	2	26.48	4.89	3.18 5.05	*	
Cepas x niveles de ePE-PU	60.30	4	15.08	2.78	2.55 3.72	*	
Error	254.70	47	5.42				
Total	448.33	55					

* Existe diferencia significativa

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan, en la tabla 2.24 se observa que el paquete estadístico reportó dos grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a y para el grupo II la letra b. En el grupo I se encuentra la cepa L5 con 0 y 5%, la cepa L9 con 0% y la cepa L15 con los tres niveles de e-PE-PU.

Tabla 2.24. Prueba Duncan para determinar diferencias significativas entre los valores de la proporción de estípite total de las 3 cepas de *L. edodes* y los 3 niveles de ePE-PU

Cepa y nivel de ePE-PU (%)	Grupos		Interpretación
	I	II	
L15, 10	15.6		15.6 ± 1.5 a
L15, 0	15.7		15.7 ± 0.8 a
L9, 0	16.1		16.1 ± 1.2 a
L15, 5	16.2		16.2 ± 1.9 a
L5, 0	16.7		16.7 ± 1.9 a
L5, 5	16.8		16.8 ± 2.3 a
L5, 10		19.5	19.5 ± 3.7 b
L9, 10		20.2	20.2 ± 2.6 b
L9, 5		20.5	20.5 ± 2.6 b

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$).

Comparación del peso promedio de cada hongo para las 3 cepas y los 3 niveles de ePE-PU

En la tabla 2.25 se observan diferencias altamente significativas en el peso promedio en las tres variables evaluadas (cepas, niveles de ePE-PU e interacción cepas x niveles de ePE-PU). La interacción entre las dos variables nos indica que para cada cepa hay un nivel de ePE-PU donde se obtuvo un mayor peso promedio de hongos por lo que se realizó la prueba de Duncan para poder determinar la cepa (s) y nivel (es) de ePE-PU donde se obtuvieron los mayores pesos promedio.

Tabla 2.25. Análisis de varianza para identificar diferencia en el peso promedio de los hongos de las cepas L5, L9 y L15 en los sustratos con 0, 5 y 10% de ePE-PU

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F			Interpretación
				Calculada	Tablas (α)		
					0.05	0.01	
Cepas	722.27	2	361.13	49.76	3.18	5.05	**
Niveles de ePE-PU	131.03	2	65.52	9.03	3.18	5.05	**
Cepas x niveles de ePE-PU	596.37	4	149.09	20.54	2.55	3.72	**
Error	333.86	46	7.26				
Total	1784.86	54					

** Existe diferencia altamente significativa

Como resultado de la prueba Duncan en la tabla 2.26 se observa que el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para la interpretación se le asigna una letra diferente a cada grupo, para el grupo I se asigna la letra a, para el grupo II la letra b, para el III la letra c, para el IV la letra d y para el grupo V la letra e. Los mayores pesos promedio se obtuvieron para la cepa L15 con 10% de ePE-PU, seguido por las cepas L5 y L15 con 5% de ePE-PU.

Tabla 2.26. Prueba Duncan para determinar diferencias significativas en los valores de peso promedio de los hongos de las 3 cepas de *L. edodes* y los 3 niveles de ePE-PU.

Cepas y nivel de ePE-PU (%)	Grupos					Interpretación
	I	II	III	IV	V	
L9, 10	8.9					8.9 ± 2.0 a
L9, 0	9.1					9.1 ± 1.6 a
L9, 5	9.4					9.4 ± 2.1 a
L5, 10	10.6					10.6 ± 2.9 a
L15, 0		11.8				11.8 ± 2.7 b
L5, 0			14.1			14.1 ± 2.5 c
L15, 5				17.2		17.2 ± 3.0 d
L5, 5				18.5		18.5 ± 3.8 d
L15, 10					25.0	25.0 ± 3.1 e

Letra diferentes en los valores de EBA indican diferencia significativa según Duncan ($\alpha = 0.05$).