

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

**“Producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Pleurotus* en
sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina”**



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

ENMA LETICIA BATZ PATAL

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICA BIÓLOGA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2010

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

**“Producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Pleurotus* en
sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina”**



ENMA LETICIA BATZ PATAL

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2010

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS: Por darme la vida, por estar conmigo guiando mis pasos y permitir llegar a este momento tan especial de mi existencia.

A MIS PADRES: Cirilo Batz y Ciriaca Patal, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí. Aunque pasamos momentos muy difíciles, siempre estuvieron apoyándome y brindándome todo su amor. Los quiero con todo mi corazón y este trabajo es también de ustedes.

A MI ESPOSO: Wilder Donald Queché, por su apoyo incondicional.

A MI HIJO: Pablo de Jesús, por ser la razón de mi vivir con mucho amor.

A MIS HERMANOS: Carolina, Ronald, Mayra, Nora, Sintia, Frank y Madelín, por su cariño, los quiero mucho.

A MIS SOBRINOS: Fernando, David, Diego, Pedro, Ángel, Daniel y Carlos, para que este triunfo les sirva de ejemplo de que con perseverancia se logra lo que se propone.

A MIS ABUELOS: Julian Patal †, Damián Batz †, Apolinaria Cocón † y en especial a Justina Coyote, por su cariño y sabios consejos.

A MIS TIOS: Por su apoyo para alcanzar mis metas y objetivos.

A MIS SUEGROS: Por su comprensión.

A MIS CUÑADOS: Con aprecio y cariño.

A MIS AMIGAS Y AMIGOS: A quienes agradezco la oportunidad de conocerlos y compartir con ellos.

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA: Por haber sido mi centro de formación profesional.

A MIS CATEDRÁTICOS: Por haberme instruido y transmitir sus conocimientos para hacer de mí una mujer profesional.

A LICDA MARÍA DEL CARMEN BRAN Y A LIC. OSBERTH MORALES ESQUIVEL: Por su asesoría, paciencia y amistad brindada durante la realización de este trabajo.

A LICDA. MARÍA LUISA DE LÓPEZ Y DR. ROBERTO FLORES: Por su apoyo al revisar este trabajo.

AL GRUPO DE MUJERES CULTIVADORAS DE *Pleurotus ostreatus* DE LA COMUNIDAD 29 DE DICIEMBRE, ZARAGOZA, CHIMALTENANGO: Por su colaboración y asistencia brindada.

AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA: Por su amistad y apoyo.

ÍNDICE

	Pag.
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES.....	4
A. Generalidades de los hongos.....	4
B. Los hongos comestibles.....	5
C. Cultivo de hongos comestibles.....	5
D. Género <i>Pleurotus</i> spp.....	8
E. Métodos para la desinfección del sustrato.....	14
1. La pasteurización.....	14
2. Esterilización.....	16
3. Fermentación aerobia.....	17
4. Fermentación anaerobia o en frío.....	18
5. Inmersión en agua alcalina.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
VI. HIPÓTESIS.....	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
VIII. RESULTADOS.....	28
IX. DISCUSIÓN.....	37
X. CONCLUSIONES.....	41
XI. RECOMENDACIONES.....	42

XII. REFERENCIAS.....	43
XIII. ANEXO.....	47

I. RESUMEN

El cultivo de hongos comestibles adquiere cada vez más interés en nuestro país y la tecnología básica al respecto ya está establecida y no requiere de gran capital para su realización. Sin embargo, para el cultivo hay que aplicar una serie de procesos técnicos que garanticen la producción de los basidiomas, siendo uno de ellos y de gran importancia, la desinfección del sustrato, para evitar el crecimiento de microorganismos indeseables que limiten el desarrollo y la calidad del hongo que se desea cultivar.

En este estudio se evaluó el crecimiento de dos cepas nativas de *Pleurotus* por medio de la producción de basidiomas en sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina, utilizando cal comercial, metodología nueva que se adapta a las condiciones de pequeños productores de nuestro país.

La cepas *P. ostreatus* 152.2005 y *P. levis* 107.2001 fueron obtenidas de inóculos primarios proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, y ensayadas en el módulo de cultivo de la Comunidad 29 de Diciembre, del municipio de Zaragoza, Chimaltenango, donde se llevaron a cabo las pruebas.

La desinfección del sustrato (olote de maíz con rastrojo de maíz picado), se realizó dejando el sustrato en remojo en agua alcalina en cuatro concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0) de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, durante 12, 24, 36 y 48 horas y efectuando cinco repeticiones para cada concentración y tiempo de inmersión.

Para la producción de cuerpos fructíferos se usaron 5-8 libras de sustrato desinfectado en bolsas de polipropileno de 25 libras, a las que se inoculó el hongo, incubándolas a continuación a temperatura ambiente. Al aparecer los primordios fúngicos, se removió totalmente la bolsa de plástico para facilitar el desarrollo de las fructificaciones, las cuales fueron cosechadas cuando alcanzaron su estado adulto.

El estudio reveló que para el cultivo de la cepa *P. levis* 107.2001 la mejor combinación entre concentración del cal y tiempo de inmersión para desinfectar el sustrato, fue de 1.5% de cal y 36 horas de inmersión ($p < 0.0001$), donde se alcanza 48.20% de eficiencia biológica y 1.10 en la tasa de producción.

Por otro lado *P. ostreatus* 152. 2005 produjo la mejor eficiencia biológica (42 %) y tasa de producción (0.96) a una concentración 0.5% de cal durante 12 horas de inmersión ($p < 0.0001$).

Los resultados obtenidos confirman que la técnica de inmersión alcalina permite la desinfección adecuada de este tipo de sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp y presenta ventajas económicas sobre otros métodos ya que no requiere de tecnología sofisticada para su realización, por lo que se recomienda su utilización en la producción artesanal.

II. INTRODUCCIÓN

En Guatemala se cultivan artesanalmente especies de *Pleurotus*, hongo comestible de gran aceptación y consumo en el país. La mayoría de módulos están ubicados en los departamentos de Sololá y Chimaltenango.

La tecnología básica del cultivo de *Pleurotus* ya está establecida y no requiere de un capital grande para su realización, pero la falta de asistencia técnica e información generalizada sobre el tema hace que este tipo de cultivo no esté muy difundido en el resto del país.

Se sabe que para el cultivo de hongos hay que aplicar una serie de procedimientos técnicos que garanticen la producción de los basidiomas, siendo uno de ellos y de gran relevancia, la desinfección de los sustratos. Si no se prevé y se evita la contaminación del sustrato, las bacterias y hongos indeseables crecerán en el mismo, limitando el crecimiento y calidad del hongo que se desea cultivar.

Para la desinfección de sustratos se han utilizado varios tratamientos como pasteurización con vapor, inmersión en agua caliente, composteo, esterilización química y fermentación láctica. Cada una presenta ventajas y desventajas dependiendo de la situación tecnológica predominante en cada lugar de producción.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el crecimiento de dos cepas nativas de *Pleurotus* por medio de la producción de basidiomas en sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina, utilizando cal comercial, metodología reciente y sencilla que se adapta a las condiciones agrosocioeconómicas de pequeños productores de nuestro país.

Se utilizaron cuatro tiempos de inmersión (12, 24, 36 y 48 horas) y cuatro concentraciones de cal (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %) para evaluar su efecto en la Eficiencia Biológica y Tasa de Producción de cuerpos fructíferos de las dos cepas.

ANTECEDENTES

A. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas, unicelulares y pluricelulares o dimórficos; carecen de clorofila, son heterótrofos, obtienen sus alimentos por absorción a través de la membrana y pared celular cuyo componente principal es la quitina. Los hongos son inmóviles y se reproducen por medio de esporas, las cuales pueden producirse sexual o asexualmente. El talo (cuerpo vegetativo) en la mayoría de los hongos es filamentoso, está constituido por filamentos delgados llamados hifas, que presentan crecimiento apical y en conjunto integran el micelio. En el caso de los hongos macroscópicos, el micelio está representado por la masa de apariencia algodonosa y por lo regular blanquecina que se localiza por debajo del mantillo en los bosques (1-3).

Los hongos son un componente vital en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas como degradadores de compuestos orgánicos, además pueden ser mediadores e integradores que contribuyen al desarrollo de las poblaciones vegetales, particularmente al de las especies arbóreas. Entre otras funciones principales destacan las siguientes: intervienen en los ciclos y transferencia de nutrimentos, al participar de manera activa en la regulación de la tasa fotosintética; a través del crecimiento de sus hifas modifican la permeabilidad y estructura del suelo; los hongos representan una fuente de alimento para algunos vertebrados (incluyendo mamíferos) e invertebrados, son hábitat de invertebrados, algas y otros hongos; participan en creación y alteración de nichos, sobre todo para invertebrados; establecen asociaciones mutualistas con plantas, termitas, hormigas y con algunas especies de algas (4-6).

Con respecto a su diversidad, Hawksworth (1997) estima que en la Tierra existen 1.5 millones de especies, si esta estimación es correcta entonces menos del 5% de las especies de hongos se han descrito. Muchos científicos han contribuido a la clasificación de todos los grupos de hongo, que filogenéticamente se han ubicado en tres reinos y once filos o divisiones: Reino Fungi: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*; Reino Straminipila: *Oomycota*, *Hyphochytriomycota*, *Labyrinthulomycota* y el Reino Protista: *Plasmodiophoromycota*, *Dictyosteliomycota*, *Acrasiomycota* y *Myxomycota* (2).

B. Los hongos comestibles:

Los hongos comestibles son conocidos desde muy antiguo, considerándose a los chinos los primeros cultivadores. Se tiene datos recientes que por el año 1500 antes de Cristo, se cultivaban en esas regiones, en forma artesanal, el hongo lignívoro *Ganoderma lucidum* el cual era utilizado en infusiones como estimulante (7).

El conocimiento tradicional sobre los hongos comestibles también se manifiesta en el gran número de nombres comunes que diversos autores han registrado, el cual supera los 400, mismos que corresponden a cerca de 200 especies. Cabe señalar que alrededor del 46% de estas especies son micorrizógenas, lo que dificulta su cultivo y la única forma de aprovecharlas es la recolección (6-7).

Entre los hongos comestibles se halla una buena parte de especies saprobias, las cuales se cultivan frecuentemente en muchas partes del mundo. Ejemplo de ello son las diferentes especies de *Agaricus*, *Pleurotus*, el shiitake de los japoneses (*Lentinus edodes*) y otros muchos para los que hay que acondicionar previamente el sustrato (8).

C. Cultivo de hongos comestibles:

La actividad meramente artesanal de cultivar hongos en forma experimental o casera ha ido dando lugar paulatinamente a pequeñas industrias y luego a verdaderas empresas, en donde el cultivo de los hongos comestibles se ha convertido en una actividad semindustrial y rentable (8).

Cuando se refiere al cultivo de hongos comestibles, se aclara que el concepto de cultivo, es el del conocimiento y dominio total del ciclo de vida del hongo en el desarrollo de su micelio vegetativo y en la aparición de los cuerpos fructíferos en cantidades tales que superen ampliamente al producto que se puede recolectar en forma espontánea (8).

Durante el siglo XVIII comienza a cultivarse en Francia, en los alrededores de París, el llamado “Champiñón de París” (*Agaricus*), que perdura hasta hoy en día y que ha hecho famoso a este hongo en todo el mundo (8).

Otra fecha muy importante en el cultivo de los hongos comestibles es por el año 1917. Falck fue el primero en reportar el cultivo de este hongo en tocones y en troncos en Europa. Más tarde, Etter (1929) produjo cuerpos fructíferos en cultivo. Block, Tsao y Han (1958, 1959) fueron los primeros en escribir un reporte detallado sobre el cultivo de *P. ostreatus* en Estados Unidos, mientras que la primera explotación comercial de este hongo fue establecida en Europa, hasta la mitad de los años setenta (3).

Esta tecnología llegó al nuevo mundo hacia finales del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX de una manera muy discreta. No fue sino hacia la segunda mitad de este siglo, gracias al mejoramiento de las técnicas existentes, que esta industria se hizo presente de una manera importante en varios países de América (10-14).

Actualmente el cultivo del *Pleurotus ostreatus* se está difundiendo ampliamente en todo el mundo y el costo por kilogramo supera en dos o tres veces al champiñón, según las variedades (15).

Datos muy recientes indican que se cultivan o se hallan en estudio para su cultivo unas 50 especies de hongos comestibles (16).

El cultivo de hongos comestibles en Guatemala comenzó en 1955 con la implementación del champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) con cepas de origen norteamericano. Posteriormente, De León *et al.* (1988) iniciaron el cultivo de *Pleurotus* a nivel de laboratorio en el Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), empleando una cepa inglesa de *P. flabellatus* (Berk. Y Br.) Sacc., que cultivaron sobre diversos sustratos (17).

1. Cultivo de *Pleurotus* en Guatemala

El cultivo comercial de *Pleurotus* spp. inició en la ciudad de Guatemala en 1986. Cuatro años después empezó a difundirse dentro del país. A partir de 2002, se fundaron pequeños proyectos en algunos departamentos. En el año 2004, fueron capacitados 222 personas en localidades de los departamentos Alta Verapaz, Quiché, Quetzaltenango,

Sololá y Huehuetenango. Se calcula que existen alrededor de 300 familias o personas involucradas en este cultivo, quienes venden el producto de la cosecha en mercados de la localidad o entre sus vecinos (17, 18).

2. Producción mundial de hongos comestibles

La producción mundial de hongos comestibles se ha incrementado más de 14 veces en 30 años, desde 350,000 mil toneladas en 1965 hasta cerca de 4,909.000 toneladas en 1994. La mayor parte de este incremento ocurrió durante los últimos 15 años, en los cuales también se observó un considerable cambio en los géneros cultivados (26). En 1979, la producción del champiñón común (*A. bisporus*) representaba más del 70 % de la oferta mundial. En 1994, solamente el 38 % de dicha producción correspondía a *A. bisporus*. La República Popular China es el mayor productor de hongos comestibles con 2,640,900 toneladas o sea el 54 % del total. En 1994, China produjo 654,000 toneladas de *Pleurotus* spp lo que representó el 82 % del total mundial. La mayor parte de la producción china es consumida localmente ya sea en forma fresca o seca (19-22).

En el ámbito mundial se han domesticado aproximadamente 22 especies fúngicas, la mayoría de regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, de éstas sólo diez presentan una producción a escala industrial, con un volumen de producción del orden de los dos millones de toneladas (13). En la actualidad la producción mundial supera los 7 millones de toneladas de hongos comestibles cultivados frescos por año (23,24).

En México sólo tres géneros de hongos se cultivan comercialmente, estos son *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*; su expansión ha sido lenta; de tal manera que en la actualidad existen alrededor de 25 medianas empresas productoras de champiñón, cuya producción conjunta para el año 1995 era de 40 ton/día, con un rendimiento de 25 Kg/m² (27). El cultivo comercial de los hongos inicia su desarrollo en la década de los 70, especialmente, en el ámbito rural dados sus bajos costos de producción y a la utilización de esquilmos agroindustriales como sustratos, Orezans (13) cita incrementos del 413 % para el período 1990 a 1997, con valores de 365 toneladas y 1,825 toneladas respectivamente (24, 25)

El mercado demandante de hongos comestibles está compuesto por países industrializados, principalmente Estados Unidos, Canadá, la Unión Europea y Japón (26).

Actualmente en nuestro país, la producción anual de *Pleurotus* es de 29,580 Kg; el 90 % de éste es consumido en Guatemala y el 10 % es exportado a El Salvador y Honduras (27).

D. Género *Pleurotus* spp

El píleo de esta seta es redondeado, con la superficie lisa y convexa cuando es joven, aplanándose luego poco a poco. El borde está algo enrollado al principio. Su diámetro oscila entre 5 y 15 cm, dependiendo de la edad del hongo. El color es variable, desde gris claro o gris pizarra hasta pardo, tomando una coloración más amarillenta conforme pasa el tiempo (27-29).

En la parte inferior del sombrero hay unas laminillas dispuestas radialmente, que van desde el pie que lo sostiene, hasta el borde. Son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Estas esporas son pequeñas, oblongas, casi cilíndricas, que en gran número forman masas de polvo o esporadas, de color blanco con cierto tono lila-grisáceo (28-29).

El pie suele ser corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro, blanco, con el principio de las laminillas en la parte de arriba y algo peloso en la base. Pueden crecer de forma aislada sobre una superficie horizontal o en grupo formando repisas laterales superpuestas sobre un costado de los árboles. La carne de la seta es blanca, de olor algo fuerte, tierno al principio y después correosa (27-29).

1. Distribución y clasificación taxonómica

El género *Pleurotus* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial e incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. *Pleurotus ostreatus* conocido también como hongo ostra, es una de las especies mayormente cultivadas; sin embargo, existen otras, denominadas “exóticas”, que son producidas en menor cantidad en

muchos países. Se conocen un número mayor de 20 especies y entre ellas se señalan a *P. cornucopiae*, *P. pulmonarius*, *P. levis*, *P. djamor*, etc. (25, 27, 29).

Singer (1975-1986) dividió el género *Pleurotus* en cinco secciones, sin embargo la sección de *Pleurotus ostreatus* es muy controversial y aún ahora, muchas especies no han sido completamente definidas o identificadas (20).

2. *Pleurotus ostreatus* (Jack)

a. Características macroscópicas: Píleo liso, a veces algo escamoso hacia el centro o base; de 5 a 10 cm de ancho o (hasta 15 cm), grisáceo con tonos o reflejos metálicos, láminas de color blanco o rosa amarillento en seco, poco o nada unidas entre sí en la base; más o menos delgadas y con bordes lisos, sésiles con estípite muy corto y mal definido, contexto color blanco, consistencia carnosa-correosa con color y sabor agradables. Crecen en grandes conjuntos sobre troncos podridos o árboles en zonas tropicales, subtropicales o bosque de pino y encino, es comestible (27, 29).

b. Características miceliarias: Micelio blanco, longitudinalmente radial, tornándose algodonoso, el micelio viejo secreta a menudo gotas amarillentas. Estado anamorfo desconocido (27).

3. *Pleurotus levis* (Berk & M.A Curtis)

a. Características macroscópicas: Píleo de 40 a 76 mm de diámetro, infundibuliforme a plano convexo con el centro deprimido, superficie cerosa, color blanco, con zonas amarillentas. En ejemplares húmedos, margen estriado, borde incurvado a levantado, levemente ondulado, cutícula desprendible con contexto blanco bajo ella. Contexto hasta 10 mm de grosor, color blanco consistencia esponjosa correosa. Sabor no determinado. Olor afrutado, con un retrogusto ligeramente metálico. Sistema hifal dimitico. Himenio con láminas decurrentes, juntas, anchas, bordes enteros, frágiles, color amarillento. Lamélulas atenuadas, bordes ondulados, anastomosadas en la base, que pueden unirse por el extremo. Trama lamelar irregular. Estípite hasta 55 mm de longitud, 10-17 mm de diámetro en el ápice y de 7-12 mm de diámetro de la base, excéntrico a lateral, algunas veces central cilíndrico, con la base, color blanco, con líneas que continúan de las

láminas a lo largo del estípote. Contexto lleno, carnoso, color blanco. Algunos ejemplares pueden presentar escróbulos distribuidos irregularmente. Esporas 7.0-11.0 x 4.0-5.0 μm , cilíndricas a elipsoides, hialinas de pared delgada (28).

b. Características miceliares: No reportadas. Estado anamorfo desconocido.

4. Esquema general del cultivo de *Pleurotus* spp

El proceso del cultivo de *Pleurotus* spp se inicia con la obtención de la cepa, la cual es la masa de micelio desarrollada sobre un medio apropiado en una caja de petri, en un tubo de ensayo o en un pequeño frasco en el laboratorio. Este micelio una vez desarrollado debe estar en refrigeración para evitar su envejecimiento y se resembrará periódicamente en otras cajas de petri con el medio apropiado y en condiciones de asepsia. Se debe incubar en una estufa a una temperatura adecuada (30-32).

a. Obtención de la cepa: La cepa se puede obtener de una casa comercial, por ejemplo, de la ATCC (American Type Culture Collection) de Estados Unidos o algún laboratorio especializado y debe tener la identificación taxonómica exacta del hongo en discusión. También se puede obtener la cepa directamente de un hongo fresco seleccionado, el cual debe ser identificado taxonómicamente y guardarlo seco en una colección oficial de hongos, para que en el futuro pueda ser reidentificado (6, 32-33).

b. Obtención del micelio e inóculo: Después de la obtención de la cepa, se procede a desarrollar masivamente el micelio en otra caja de petri, para la preparación del inóculo en frascos o bolsas que servirá a su vez para el cultivo del hongo en el sustrato seleccionado. El medio de la segunda caja de petri con el micelio ya desarrollado se cuadrícula con un bisturí, de tal manera que se obtengan bloques de 1 cm cada uno, éstos se pondrán dentro de un frasco esterilizado de boca ancha con semilla seleccionada y previamente esterilizada (32-33).

c. Preparación de sustrato: Paralelamente al proceso anterior, se debe ir preparando el sustrato que se seleccionó para el cultivo según los materiales disponibles en

la región y según el hongo que se va a cultivar. Pero sea cual sea el sustrato, este se someterá a un proceso de desinfección para eliminar los microorganismos presentes en el mismo y que pueden infectar y competir con el crecimiento del hongo que se va a cultivar. (34-37)

d. Siembra: Una vez desinfectado el sustrato se procede a la inoculación con el hongo que previamente se preparó, para ello se mezcla uniformemente el micelio del hongo creciendo en las semillas con el sustrato desinfectado o pasteurizado que es el proceso más utilizado para este fin, todo esto dentro de las bolsas de plástico de 50 x 70 cm a las cuales se les pone aproximadamente 20 libras de sustrato por un frasco de inóculo de ½ litro o su equivalente en bolsa. A continuación se cierra bien la bolsa, se etiqueta con el número de la cepa empleada y la fecha de siembra y se acomoda en un estante en condiciones de oscuridad y a una temperatura de alrededor de 28 °C. (32, 38).

Al tercer día de tener las bolsas inoculadas en la oscuridad, se perforan para facilitar la aireación y el desarrollo del micelio. A partir de la tercera semana, se colocan las bolsas bajo la luz indirecta de la planta en donde se cultivarán los hongos (38).

e. Fructificación y cosecha del hongo: Una vez que se empiecen a formar los primordios de las fructificaciones de los hongos, se remueve totalmente la bolsa de plástico para facilitar el desarrollo de las fructificaciones, mismos que alcanzarán su estado adulto en 5 días quedando listos para la cosecha. Cada bolsa soporta entre 2 a 3 cosechas, en intervalos de 10 días y en forma decreciente de rendimiento, hasta que se desechan por ser ya muy poco productivas. La producción total en peso de cada bolsa es de 1-1.5 kg. Una vez cosechados los hongos, están listos para el consumo (38).

La producción de los hongos se valora en kg por sustrato, mediante la fórmula de dividir el peso fresco de los hongos cosechados entre el peso seco del sustrato empleado, lo que se le denomina Eficiencia Biológica y se expresa en %. Una eficiencia biológica adecuada debe ser de alrededor o más del 100 %, según las evaluaciones de cultivo de hongos propuestos por Tchierpe y Hartman (34, 38).

5. Factores que afectan el crecimiento y la fructificación de *Pleurotus* spp.

Los hongos, necesitan para su crecimiento condiciones específicas de temperatura, humedad, pH, luz y aireación. Para cada uno de estos factores, existe un rango delimitado por un punto mínimo y un punto máximo, bajo y sobre los cuales no habrá crecimiento (33-38). Entre los requerimientos considerados más importantes se encuentran:

a. La temperatura: Ésta afecta el metabolismo de las células, influyendo en la capacidad enzimática del organismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. *Pleurotus* es un género cuyo micelio puede crecer en un rango amplio de temperaturas. Se reporta que las especies de *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. cornucopiae*, crecen en un rango entre 0 y 35 °C con temperaturas óptimas de 30°C para la primera y de 25°C para las dos últimas. También hay especies que pueden soportar 40°C durante 24 horas (pero no 72 h) y después reiniciar su crecimiento (38).

b. El pH: El potencial de hidrógeno del medio de cultivo donde crece el hongo influye directamente sobre éste, porque incide sobre el carácter iónico del medio e influye sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; afectando así su metabolismo (38-39).

Entonces para el crecimiento de las especies de *Pleurotus* se han citado rangos de crecimiento entre 4 y 7 de pH, con un óptimo entre 5 y 6. Este valor sin embargo suele variar entre cepas y especies (32, 38-39).

Dado que la mayoría de los contaminantes que se encuentran durante el proceso de cultivo son más sensibles a los valores altos de pH que las especies de *Pleurotus*, actualmente al preparar el sustrato se prefieren valores más elevados que los señalados como óptimos (38-39).

c. La humedad en el sustrato: El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo de los hongos porque afecta la disponibilidad de nutrientes y del oxígeno. Así, los contenidos de humedad inferiores al 50% no serán propicias y una

humedad superior al 80% tendrá un efecto negativo en el crecimiento de *Pleurotus* spp. El contenido óptimo de humedad depende no sólo de la especie de hongo que se cultiva, sino también del tipo de sustrato utilizado (36-38).

d. La humedad del aire: Este es un factor de suma importancia para la adecuada fructificación de las especies de *Pleurotus*, dado que los cuerpos fructíferos están formados por un alto contenido de agua y su estructura hifal no les permite retener la humedad en condiciones adversas, un balance adecuado entre la humedad ambiental y el contenido de humedad del hongo es necesario. En general los hongos son muy susceptibles a las variaciones en la humedad relativa por lo que el rango de humedad relativa adecuado para *Pleurotus* es entre 70-85 % (38).

e. La aireación: El oxígeno es un elemento de gran importancia para el crecimiento de los basidiomicetos porque son organismos aerobios. Estos organismos presentan requerimientos de oxígeno diferentes según el estado fisiológico en que se encuentren. Para el caso de especies *Pleurotus*, se ha notado que la concentración alta de CO₂ estimula la germinación de las esporas y el crecimiento micelial pero inhibe la fructificación. La fructificación suele darse en condiciones normales cuando se tiene un 20 % de oxígeno y una concentración de CO₂ no mayor de 800 ppm en el ambiente que circunda al hongo (36-38).

f. La luz: La sensibilidad tanto de la cantidad como de la calidad de la luz depende de las especies, Eger indica que la sensibilidad a la luz es máxima desde momentos previos hasta horas después de que el micelio ha colonizado el sustrato (38).

g. Requerimientos nutritivos: Las especies de *Pleurotus* crecen de manera aceptable en diversos sustratos lignocelulósicos, por lo que pudiera pensarse que una cepa dada crecerá bien en cualquier sustrato posible. Esto no es cierto, existen una interrelación cepa-sustrato que debe respetarse para obtener rendimientos óptimos. Cada cepa tiene sus capacidades y requerimientos propios por lo que una vez que se han definido los componentes óptimos del sustrato, deben evitarse los cambios, a menos que hayan sido investigados previamente (37-40).

E. Métodos para la desinfección del sustrato:

1. La pasteurización

Es un proceso que prepara el sustrato para una eficaz colonización del hongo, puede darse por medio de un proceso de composteo durante la preparación del sustrato, de fermentación, o mediante un tratamiento químico o térmico, después de haber mezclado y homogenizado los ingredientes (37, 41-42).

Este método tiene como finalidad destruir insectos y microorganismos competidores de especies de *Pleurotus*, pero al realizar esta, también provoca cambios bioquímicos en el sustrato que pueden afectar positiva o negativamente su calidad. En efecto, la idea de que mientras mayor sea la temperatura o el tiempo, mejor será el tratamiento, es errónea se sugieren temperaturas de pasteurización de 65°C durante 20-24 horas y que temperaturas inferiores a 55°C es insuficiente para destruir otros organismos. Por otro lado temperaturas mayores de 85°C provocan la ruptura parcial de puentes de hidrógeno del complejo lignina celulosa que contribuyen a la solubilización de azúcares simples. Estas condiciones predisponen al sustrato para una colonización mayor por hongos contaminantes (6, 35-38, 42).

La pasteurización no proporciona una protección natural del sustrato contra las contaminaciones fúngicas, especialmente si se trata de *Trichoderma* spp. Por esta razón, en este procedimiento se ha ido imponiendo como complemento el uso de fungicidas para conseguir una cierta protección artificial (37, 40).

En el caso del tratamiento térmico al sustrato, comercialmente existen dos posibilidades: con agua caliente o con vapor.

a. La pasteurización con agua caliente: El método consiste en sumergir el sustrato en agua a 85°C durante un mínimo de 40 minutos (11). Este tratamiento puede variar según la localidad, ya que la altura sobre el nivel del mar y las condiciones del lugar influyen en los parámetros de operación. En 1979 en la India, al cultivar *P. djamor*, utilizando un tratamiento de inmersión durante 10-15 minutos a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ y posteriormente inmersión de dos horas en agua fría, se obtuvieron buenos rendimientos sólo cuando utilizaron altas tasas

de inoculación (15%), mientras que cuando utilizaron tasas más bajas (2.5 %), se produjeron altos índices de contaminación y bajos rendimientos (7, 37).

Al pasteurizar por inmersión en agua se debe sumergir el sustrato únicamente cuando el agua haya alcanzado la temperatura de pasteurización para provocar choque térmico, que difícilmente soportarán los organismos que se encuentren en el sustrato (36-38).

La inmersión en agua caliente ha sido ampliamente recomendada y puede considerarse como una forma sencilla de pasteurización, por los bajos costos de instalación y lo rudimentario que puede ser el acondicionamiento del método; sin embargo tiene sus limitaciones, porque es ineficiente desde el punto de vista energético (lo que la hace operable sólo cuando se trabaja a muy pequeña escala) y produce aguas residuales altamente contaminantes. Por otra parte, puede funcionar bien en lugares donde la humedad ambiental es baja y permite el escurrido rápido del agua excedente. Si la humedad relativa del lugar es alta, el control del contenido de agua en el sustrato después de la pasteurización puede requerir mayor manipulación del sustrato, lo que incrementa los riesgos de contaminación (37- 38).

b. La pasteurización por vapor: Es un método que requiere más inversión que la anterior porque necesita al menos de un generador de vapor. Este método sin embargo ha ido ganando adeptos porque se puede desarrollar también de manera relativamente rústica y es más rentable a mayor escala que la pasteurización en agua caliente (38).

El método utilizado actualmente es una adaptación del método que se usa para la pasteurización de suelo; consiste en colocar el sustrato, en un espesor de hasta 60 cm, dentro de una caja o recipiente cerrado que tiene el fondo perforado. Después se introduce en la parte alta de la caja una mezcla de vapor y aire a presión hasta que el sustrato alcanza una temperatura de 65°C, los cuales se mantienen durante una hora. Al cabo de este tiempo se suprime el vapor y se deja la ventilación para que se enfríe (37-40, 42).

2. Esterilización

Este procedimiento es típico y casi exclusivo de los trabajos de investigación. Resulta muy apto para conocer de forma preliminar el comportamiento de sustratos a base de materiales (o mezclas) de cierto carácter novedoso, o para comprobar respuestas de diferentes cepas o variedades ensayadas comercialmente (37-41).

Consta preliminarmente de una preparación en crudo del material o mezcla seleccionados. El sustrato, convenientemente picado, hidratado y homogenizado, se coloca en pequeños contenedores de polipropileno, quedando así dispuesto para que se le aplique el tratamiento térmico, el tratamiento de esterilización generalmente se lleva a cabo en un autoclave, con vapor a 121°C durante una hora o dos según el tamaño del contenedor. Concluida esta operación y una vez que el material se ha enfriado, se debe realizar la siembra del micelio en condiciones asépticas, ya que en esos momentos el sustrato es muy susceptible a la contaminación (37, 41-42).

a. Semiesterilización térmica: Este método se da cuando las temperaturas drásticas de esterilización se rebajan sensiblemente, situándose en niveles inferiores a los 100 °C esta variante se aplica para cantidades de preparado que superen las dimensiones reducidas de trabajo del sistema de esterilización, ya que el sustrato puede ser alojado y tratado en masa, en el interior de cámaras de varias toneladas de capacidad. El margen de tratamiento de semiesterilización está comprendido aproximadamente entre 70 y 100 °C. Si el tratamiento elegido está por la zona de los 70°C, la duración debe ser de 6 a 24 horas, y si las temperaturas que se aplican están por la cola superior (p.e., 95°C) basta con 1 o 2 horas. La semiesterilización elimina los patógenos que puedan portar las materias primas del sustrato, pero no protege de contaminaciones eventuales posteriores. En la actualidad es una práctica poco utilizada (37, 43).

b. Esterilización química: Es un procedimiento de protección del sustrato para *Pleurotus* spp que se basa en la aplicación de productos químicos con poder fungicida (37).

3. Fermentación aerobia

Es un procedimiento de preparación de sustrato que profundiza en el sistema de la pasteurización simple. Trata de reforzar la escasa protección que posee frente a las contaminaciones sin necesidad de recurrir al uso de fungicidas. Este procedimiento supone la realización de dos etapas consecutivas, la pasteurización convencional y una fermentación termófila de acondicionamiento (37).

La base de la protección biológica del sustrato está en la conducción adecuada de una fermentación bacteriana tras la pasteurización. Los fundamentos de esta forma de operar se dieron a conocer por primera vez en Hungría en 1970 y patentada en Francia en 1971 (37-38).

Sánchez (2001) menciona que Flick, Stanek y Bis'ko (1982) observaron que la adición de *B. macerans* a los sustratos antes de la fermentación da como resultado un descenso de la influencia negativa de mohos contaminantes (p.e., *Trichoderma* spp.) y un incremento de los rendimientos de *P. ostreatus* de 30-100 % (37).

Más recientemente, se han vuelto a tratar los contenidos esenciales de la fermentación bacteriana como mecanismo para obtener la selectividad biológica de un sustrato. El principio del tratamiento del sustrato consiste en un control sofisticado de la sucesión microbiológica, de tal manera que la preparación del sustrato debe ser interrumpida, para proceder a sembrarlo, en el momento exacto en que se da una composición óptima de nutrientes para *Pleurotus* spp. Debido a la complejidad de los procesos bioquímicos implicados, los resultados que se obtienen, por ejemplo, con un tipo de pajas, no son extrapolables cuando se dispone de otras pajas diferentes u otros materiales (37-38).

4. Fermentación anaerobia o en frío:

El principio bioquímico de la operación se basa en que todos estos materiales al ser sumergidos en agua sufren una fermentación anaerobia por acción de las bacterias lácticas, principalmente cocos, presentes de forma natural. Entre 12 y 30°C, la fermentación

comienza espontáneamente y la acción metabólica de estas bacterias elimina los azúcares, impidiendo que posteriormente pueda tener lugar el desarrollo de los competidores de especies de *Pleurotus* tales como *Trichoderma*, *Penicillium*, etc. y facilita la acción de los enzimas del hongo sobre el sustrato. Los ácidos orgánicos formados (láctico, butírico) también van acompañados de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (4, 37-40).

Es conveniente, casi necesario, añadir sacarosa (aproximadamente el 1 % del peso de los materiales a fermentar) para estimular y mantener una fermentación vigorosa (37).

Las temperaturas más adecuadas para desarrollar el proceso, está entre 20 y 30 °C, la operación suele durar entre cinco y siete días. Durante las 3-4 primeros días el sustrato flota, ya que entre otros metabolitos, la fermentación, produce anhídrido carbónico (CO₂). A partir del 4º-5º día de fermentación, todo el material se ha hundido y comienza a acercarse el final de la operación, destacándose una película flotante de levaduras lácticas por el medio. Una prolongación anormal del proceso con el sustrato hundido desencadenaría cambios de otro signo, siendo el más destacable la subida del pH por acción de las levaduras lácticas al comenzar a consumir el ácido láctico producido durante la etapa anterior (4-6, 37-39).

Terminado el proceso, es indispensable realizar un escurrido rápido y eficaz del sustrato para lo cual es muy aconsejable el uso de una prensa manual o mecánica. Si no se ejecuta bien esta operación, el micelio, tras la siembra, se ahogaría y se contaminaría. Tras el escurrido, con una humedad final en torno al 70 %, el sustrato debe ser sembrado lo antes posible, en sacos de polietileno transparente y con agujeros de 15-20 mm de diámetro hechos previamente (37).

5. Inmersión en agua alcalina

Este es una de las técnicas más recientes que se practican en el cultivo de hongos. La desinfección con cal es un proceso propuesto como una alternativa, en la que se utiliza agua alcalinizada con cal comercial [Ca(OH)₂], destruyendo de esta manera semillas,

insectos, parásitos, hongos y bacterias, que pueden contaminar el sustrato y que pueden competir con el hongo de interés (44-48).

Se trata de sumergir el sustrato en agua alcalinizada con cal comercial durante cierto tiempo dependiendo del sustrato y de las condiciones ambientales del lugar de cultivo. Según estudios realizados en México, la concentración y el tiempo adecuado para la preparación es de 0.5 % y 24 horas respectivamente en donde se alcanza una alta eficiencia biológica (44).

Esta técnica tiene una gran ventaja sobre las otras por ser un método en frío, alternativa para evitar el uso de altas temperaturas y por lo consiguiente un gasto energético (44-45).

Actualmente sólo se sabe que este método de desinfección del sustrato es el más utilizado en Guatemala para el proceso del cultivo de hongos, pero de una forma empírica, porque no existe ningún protocolo con indicaciones precisas (concentraciones de cal y tiempos de inmersión) por tipo de sustrato, ambiente y tipo de cultivo fúngico.

III. JUSTIFICACIÓN

La tecnología del cultivo de hongos comestibles en Guatemala no es desconocida, ya que no sólo existen empresas productoras sino que actualmente también hay más de 200 módulos de producción artesanal que se dedican al cultivo de *Pleurotus*, especialmente, en los departamentos de Sololá y Chimaltenango. En estas localidades, para evitar los problemas de contaminación de cultivos, el sustrato se desinfecta sumergiéndolo en agua con cal (agua alcalina), utilizando una gran variedad de concentraciones de cal y tiempos de inmersión. Esta técnica, si bien es útil, sigue siendo empírica, por lo que es de suma importancia sistematizarla y utilizarla adecuadamente.

Por lo que se hizo necesario evaluar la productividad de dos cepas nativas de *Pleurotus* mediante sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina, utilizando diferentes tiempos de inmersión y diferentes concentraciones de cal, además cuantificar la eficiencia biológica y tasas de producción para verificar cuál era la concentración de cal y tiempo de inmersión donde las cepas produjeran mayor cantidad de cuerpos fructíferos.

Este trabajo contribuirá a que los pequeños productores superen problemas que enfrentan en cuanto a métodos de cultivo y favorecer el desarrollo económico y social de sus comunidades.

IV. OBJETIVOS

A. General:

Evaluar la productividad de cepas nativas de *Pleurotus*, a través de la producción de cuerpos fructíferos en sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina.

B. Específicos:

1. Establecer la eficiencia biológica de cepas nativas de *Pleurotus*, a través de la producción de basidiomas en sustratos desinfectados por inmersión en diferentes tiempos y concentraciones de agua alcalina.

2. Cuantificar la tasa de producción de cepas nativas de *Pleurotus* en sustratos desinfectados por inmersión en diferentes tiempos y concentraciones de agua alcalina.

V. HIPÓTESIS

1. La Eficiencia Biológica de las cepas nativas de *Pleurotus* es mayor en por lo menos un tiempo de inmersión y una concentración de agua alcalina.
2. La Tasa de Producción de las cepas nativas de *Pleurotus* es mayor en por lo menos un tiempo de inmersión y una concentración de agua alcalina.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Las cepas nativas aisladas en Guatemala de *Pleurotus*

B. Población

Cepas nativas de *Pleurotus*

C. Muestra

Dos cepas nativas de *Pleurotus* (*P. ostreatus* 152.2005 y *P. levis* 107.2001)

D. Recursos

1. Humanos

Autor: Profa. Enma Leticia Batz Patal

Asesores: Licda. María del Carmen Bran González
Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel

Grupo de Mujeres: “Cultivadoras de *Pleurotus ostreatus*”
Comunidad 29 de Diciembre. Zaragoza,
Chimaltenango

2. Materiales

a. Cepas

Las dos cepas de *Pleurotus*, provienen de aislamientos realizados con hongos colectados en diferentes localidades de Guatemala y se encuentran depositados en el Cepario de Hongos Micorrícicos y Sapróbios del Departamento de Microbiología.

b. Sustratos

1. Maicillo donado por la tesista
2. Olote de maíz proveniente de la comunidad en donde se trabajó.
3. Caña de milpa

c. Equipo

- Autoclave
- Incubadora de 18 °C

- Balanza semianalítica Metler
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Mechero

d. Reactivos

- Cal hidratada comercial

e. Otros

- Papel craft
- Maskin tape
- Agua desmineralizada
- Algodón
- Alcohol
- Marcadores
- Guantes
- Bata
- Mascarillas
- Bolsas de plástico de 25 libras
- Baldes de plásticos grandes
- Regaderas

E. Procedimiento

Todos los pasos para el cultivo del hongo, se realizaron bajo condiciones de asepsia y el material que se utilizó fue esterilizado en autoclave.

a. Obtención de las cepas: La cepas de *P. ostreatus* 152.2005 y *P. levis* 107.2001 procedente de San Mateo Ixtatán, Huehuetenango, son las que se utilizaron en este estudio y fueron obtenidas de inóculos primarios proporcionado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, cuya identificación taxonómica es exacta.

b. Obtención del micelio e inóculo: Después de la obtención de la cepa, se procedió a desarrollar masivamente el micelio en las bolsas con el sustrato seleccionado para la producción del inóculo.

Para ello, primero se puso a remojar la semilla, una vez hidratada se introdujo en las bolsas de plástico y se esterilizó en el autoclave, ya enfriadas las bolsas se inoculó con las semillas cubiertas por micelio y se mezcló. La semilla que se empleó fue maicillo y las bolsas preparadas se incubaron a una temperatura de 18°C. durante 30 días aproximadamente, hasta que el micelio cubrió todas las semillas. Se obtuvieron cinco bolsas secundarias por cada bolsa primaria, proceso que se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia luego se transportaron en el lugar de cultivo (módulo de la Comunidad 29 de Diciembre, en el municipio de Zaragoza, Chimaltenango)

c. Preparación de sustrato: Paralelamente al proceso anterior, se preparó el sustrato (olote de maíz con rastrojo de maíz) picado en pedazos de aproximadamente 2-4 cm, el cual fue sometido al proceso de desinfección para eliminar los microorganismos presentes en el mismo y que podían infectar y competir con el crecimiento del hongo.

La preparación del agua alcalina consistió en realizar cuatro concentraciones diferentes con $\text{Ca}(\text{OH})_2$: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% donde se remojó el sustrato picado durante 12, 24, 36, 48 horas para las dos cepas. Se realizaron cinco repeticiones para cada variable de concentración y tiempo.

El exceso de agua alcalinizada se eliminó escurriendo el material durante una hora aproximadamente. Por último se pesó aproximadamente 5-8 libras del material húmedo, que se introdujeron en bolsas de polipropileno de 25 libras.

d. Siembra: Una vez desinfectado el sustrato se procedió a la inoculación con el hongo que previamente se preparó. Para ello se mezcló uniformemente media bolsa de inóculo de ½ libra con el sustrato desinfectado. A continuación se cerró bien la bolsa, se

perforó en la parte superior, a un lado del nudo, cerrándolo con un pedazo de gasa estéril y sellada con maskin tape para facilitar la aireación y el desarrollo del micelio. Seguidamente se etiquetó cada bolsa sembrada con el número de la cepa empleada, la fecha de siembra, peso del sustrato, concentración de cal y tiempo de inmersión luego se acomodó en un estante en condiciones de oscuridad y a una temperatura de alrededor de 28 °C.

En este paso del procedimiento se trabajó en condiciones de asepsia utilizando redecillas, mascarillas, guantes quirúrgicos y gabachas.

e. Incubación: Se incubó las bolsas sembradas con el inóculo a temperatura ambiente, durante cuatro a cinco días después de la siembra, luego se realizaron perforaciones con una navaja o aguja estéril, perfectamente distribuidas en la parte superior de la bolsa.

f. Fructificación y cosecha del hongo: Inmediatamente que se empezaron a formar los primordios de las fructificaciones de los hongos, se removió totalmente la bolsa de plástico para facilitar el desarrollo de éstos, hasta que alcanzaron su estado adulto listos para su cosecha. Cada bolsa soportó entre 2 a 3 cosechas, en intervalos de aproximadamente 10 días y en forma decreciente de rendimiento, hasta que se desecharon por ser ya muy poco productivas. La producción total en peso fresco de hongos varió de bolsa a bolsa.

Se registró la fecha de fructificación, la fecha de la primera, segunda y tercera cosecha y el peso obtenido en cada cosecha para luego cuantificar las dos variables de este estudio.

g. Cálculo de la Eficiencia Biológica y Tasa de Producción: Luego de cosechar y pesar los cuerpos fructíferos, se calculó el porcentaje de Eficiencia Biológica, utilizando la siguiente fórmula: % EB = (peso de los hongos/peso seco del sustrato) * 100.

La Tasa de Producción se calculó así: TP = % EB/días requeridos para la cosecha.

F. Diseño Experimental

El diseño fue factorial 4x4 (4 concentraciones y 4 tiempos de remojo) para cada cepa.

- 4 concentraciones de cal: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %
- 4 tiempos de remojo: 12, 24, 36 y 48 horas

Análisis estadístico:

Se realizó un análisis ANOVA para un diseño factorial y posteriormente se efectuó la prueba de comparaciones múltiples de DUNCAN, para evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre tiempos de inmersión y concentraciones de cal para cada cepa, tanto para Eficiencia Biológica (EB) que se evaluó como porcentaje y para tasa de producción (TP) con base en el porcentaje diario de Eficiencia Biológica (% EB/días).

VII. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del estudio sobre la evaluación de la producción de cuerpos fructíferos de dos cepas de *Pleurotus* sobre sustratos desinfectados por inmersión en agua alcalina a diferentes concentraciones de cal y diferentes tiempos de inmersión.

Para la cepa *P. levis* 107.2001 se observó que a las 12 horas de inmersión del sustrato, la mayor Eficiencia Biológica (EB) se obtuvo en la concentración 1.5 % de cal (19.20%) y la menor en la concentración 0.5 % de cal (10.33 %). A las 24 horas de inmersión, la mayor EB se observó en la concentración 0.5 % de cal (34.80%), y la menor en la concentración 1.0 % de cal (10.00 %). A las 36 horas de inmersión, la mayor EB se alcanzó en la concentración 1.5 % de cal (48.20%), y la menor en la concentración 0.5 % de cal (11.76 %). Finalmente a las 48 horas de inmersión del sustrato, la mayor EB se logró en la concentración 1.5 % de cal (24.00%), en tanto que la menor EB se obtuvo en la concentración 2.0 % de cal (11.20 %) (Tabla 1).

También se determinó los valores del pH del sustrato, observándose que el rango varió entre 10.15 a 11.90, aumentando conforme aumentaba la concentración de cal y tiempo de inmersión (Tabla 1).

Tabla 1. Eficiencia biológica de la cepa *P. levis* 107.2001, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (horas)	Concentración de cal (%)	Valor del pH del sustrato	Eficiencia Biológica \pm DS (%) ¹
12	0.5	10.15	10.33 \pm 6.66
	1.0	10.80	13.33 \pm 6.66
	1.5	11.25	19.20 \pm 7.36*
	2.0	11.70	12.33 \pm 2.08
24	0.5	10.35	34.80 \pm 4.82*
	1.0	11.35	10.00 \pm 5.29
	1.5	11.54	23.00 \pm 3.16
	2.0	11.75	24.00 \pm 2.83
36	0.5	10.48	11.76 \pm 5.28
	1.0	11.50	26.00 \pm 7.07
	1.5	11.60	48.20 \pm 7.26*
	2.0	11.78	29.60 \pm 9.26
48	0.5	10.57	14.50 \pm 6.66
	1.0	11.58	13.00 \pm 2.94
	1.5	11.64	24.00 \pm 3.81*
	2.0	11.90	11.20 \pm 5.76

¹Los valores representan la media y desviación estándar obtenidas en cinco réplicas.

*Los datos en negritas indican la mayor Eficiencia Biológica obtenida.

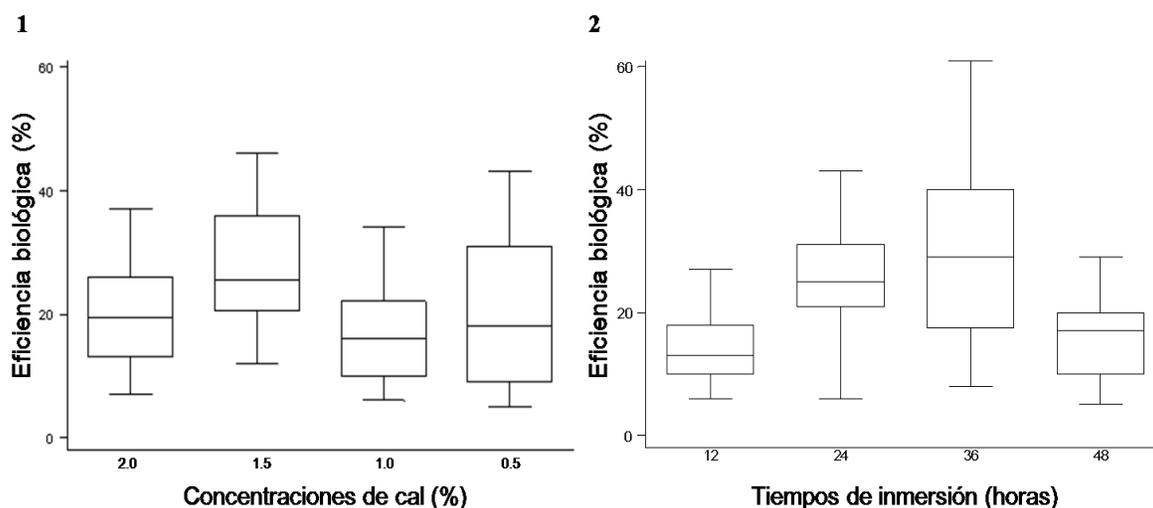
El análisis comparativo de la EB indicó diferencia significativa entre las concentraciones de cal ($p < 0.0001$), los tiempos de inmersión ($p < 0.00001$) y en la interacción concentración-tiempo ($p < 0.00001$) (Anexo 2).

Al comparar las concentraciones de cal (independientemente del tiempo de inmersión) se observó que la EB obtenida con 1.5 % de cal fue significativamente mayor que la encontrada con 1.0 % de cal ($p = 0.027$). Sin embargo, la EB con 1.5 % de cal no fue significativa respecto a las obtenidas en las concentraciones 2.0 % y 0.5 % ($p > 0.05$) (Gráfica 1).

En cuanto a los tiempos de inmersión (independientemente de la concentración de cal), la inmersión del sustrato durante 36 horas produjo una EB significativamente mayor respecto a la obtenida en 48 horas ($p = 0.003$) y 12 horas ($p = 0.003$), pero no en cuanto al período de inmersión de 24 horas ($p > 0.05$) (Gráfica 1).

Con estos resultados se puede decir que a las 36 horas de inmersión y a una concentración de cal de 1.5 %, se obtuvo una EB relativamente mayor que en los demás tratamientos (Gráfica 1).

Gráfica 1. Eficiencia biológica de la cepa *P. levis* 107.2001, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.



1. la EB obtenida fue mayor en la concentración de cal 1.5 %. 2. La EB observada fue mayor a las 36 horas de inmersión.

Respecto a la Tasa de Producción (TP) de *P. levis* 107.2001 en cuanto a los tiempos de inmersión del sustrato, se observó una mayor TP en la concentración 1.5 % de cal (0.35) y la menor en la concentración 0.5 % de cal (0.13) a las 12 horas de inmersión del sustrato. A las 24 horas de inmersión, la mayor TP se observó en la concentración 0.5 % de cal (0.77) y la menor en la concentración 1.0 % de cal (0.17). A las 36 horas de inmersión del sustrato, la mayor TP se alcanzó en la concentración 1.5 % de cal (1.10) y la menor se obtuvo en la concentración 0.5 % de cal (0.25), finalmente a las 48 horas de inmersión del sustrato, la mayor TP se encontró en la concentración 1.5 % de cal (0.41), en tanto que la menor en la concentración 2.0 % de cal (0.14) (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio de TP de la cepa *P. levis* 107.2001, cultivados en sustratos desinfectados en diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (horas)	Concentración de cal (%)	Valor del pH del sustrato	Tasa de Producción \pm DS (EB/día) ¹
12	0.5	10.15	0.13 \pm 0.07
	1.0	10.80	0.19 \pm 0.09
	1.5	11.25	0.35 \pm 0.18
	2.0	11.70	0.20 \pm 0.03
24	0.5	10.35	0.77 \pm 0.10*
	1.0	11.35	0.17 \pm 0.08
	1.5	11.54	0.39 \pm 0.14
	2.0	11.75	0.44 \pm 0.11
36	0.5	10.48	0.25 \pm 0.10
	1.0	11.50	0.51 \pm 0.11
	1.5	11.60	1.10 \pm 0.22*
	2.0	11.78	0.68 \pm 0.23
48	0.5	10.57	0.31 \pm 0.18
	1.0	11.58	0.21 \pm 0.08
	1.5	11.64	0.41 \pm 0.15*
	2.0	11.90	0.14 \pm 0.09

¹Los valores representan la media y desviación estándar obtenidas en cinco réplicas.

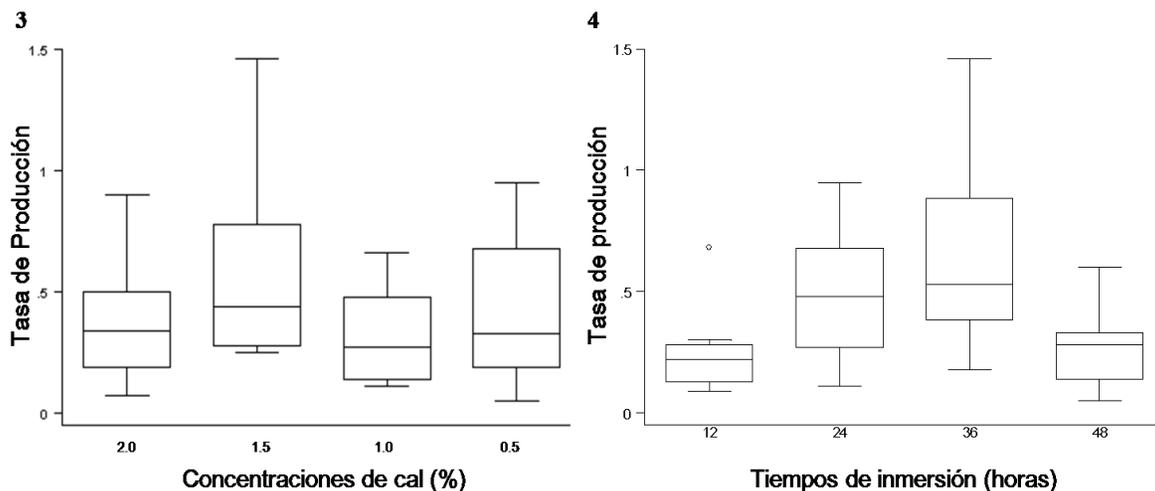
*Los datos en negritas indican la mayor Tasa de Producción de la cepa.

El análisis de la TP de la cepa *P. levis* 107.2001 mostró diferencia significativa entre concentraciones de cal ($p < 0.00001$), tiempos de inmersión ($p < 0.00001$) y en la interacción entre la concentración de cal y tiempo de inmersión ($p < 0.00001$) (Anexo 3).

Al comparar las concentraciones de cal (independientemente del tiempo de inmersión) se observó que la TP obtenida en la concentración 1.5 % de cal fue significativamente mayor que la encontrada en la concentración 1.0 % ($p=0.0401$). Sin embargo, la TP en la concentración de cal de 1.5% no fue significativamente diferente a la obtenida en las concentraciones 2.0 % y 0.5% de cal ($p>0.05$) (Gráfica 2).

La comparación de los tiempos de inmersión (independientemente de la concentración de cal) indicó que la inmersión del sustrato durante 36 horas presentó una TP significativamente mayor a la obtenida a las 48 horas ($p<0.0001$) y 12 horas ($p<0.0001$), pero sin diferencia significativa a las 24 horas ($p>0.05$) (Gráfica 2).

Gráfica 2. Tasa de producción de la cepa *P. levis* 107.2001, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.



1. La TP obtenida fue mayor en la concentración de cal 1.5 %. 2. La TP observada fue mayor a las 36 horas de inmersión.

Con respecto a los resultados de EB y TP de la cepa de *P. levis* 107.2001, cultivada sobre sustratos desinfectados con agua alcalina y tiempos de inmersión, se puede concluir que la mejor combinación de concentración de cal y tiempo de inmersión fue 1.5 % de cal y 36 horas de inmersión (Gráficas 1 y 2)

Para la cepa *P. ostreatus* 152.2005 se encontró que con 12 horas de inmersión del sustrato, la mayor EB se obtuvo con 1.0 % de cal (45.82 %) y la menor en la concentración de 2.0 % de cal (25.64 %). A las 24 horas de inmersión, la mayor EB se observó en la concentración de 0.5 % de cal (42.00 %) y la menor con 2.0 % de cal (13.03 %). A las 36 horas de inmersión, la mayor EB se alcanzó en la concentración de 0.5 % de cal (39.8 %) y la menor con 2.0 % de cal (18.44 %). De igual forma, a las 48 horas de inmersión del sustrato la mayor EB se logró en la concentración de 0.5 % de cal (30.02 %), en tanto que la menor en la concentración de 2.0 % de cal (18.70 %) (Tabla 3).

También se determinaron los valores del pH del sustrato, observándose que el rango varió entre 10.15 a 11.90, aumentando conforme aumentaba la concentración de cal y tiempo de inmersión (Tabla 3).

Tabla 3. Eficiencia biológica de la cepa *P. ostreatus* 152.2005, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (horas)	Concentración de cal (%)	Valor del pH del sustrato	Eficiencia Biológica \pm DS (%) ¹
12	0.5	10.15	41.60 \pm 2.30*
	1.0	10.80	45.82 \pm 2.53
	1.5	11.25	35.82 \pm 2.48
	2.0	11.70	25.64 \pm 6.31
24	0.5	10.35	42.00 \pm 3.87*
	1.0	11.35	18.00 \pm 6.14
	1.5	11.54	20.80 \pm 5.93
	2.0	11.75	13.03 \pm 4.50
36	0.5	10.48	39.08 \pm 4.32*
	1.0	11.50	23.68 \pm 5.12
	1.5	11.60	22.40 \pm 5.37
	2.0	11.78	18.44 \pm 7.89
48	0.5	10.57	30.20 \pm 9.34*
	1.0	11.58	20.20 \pm 4.82
	1.5	11.64	22.40 \pm 2.19
	2.0	11.90	18.70 \pm 4.97

¹Los valores representan la media y desviación estándar obtenidas en cinco réplicas.

*Los datos en negritas indican la mayor Eficiencia Biológica obtenida.

El análisis comparativo de la EB obtenida para la cepa *P. ostreatus* 152.2005 indicó diferencia significativa entre concentraciones de cal ($p < 0.00001$), tiempos de inmersión

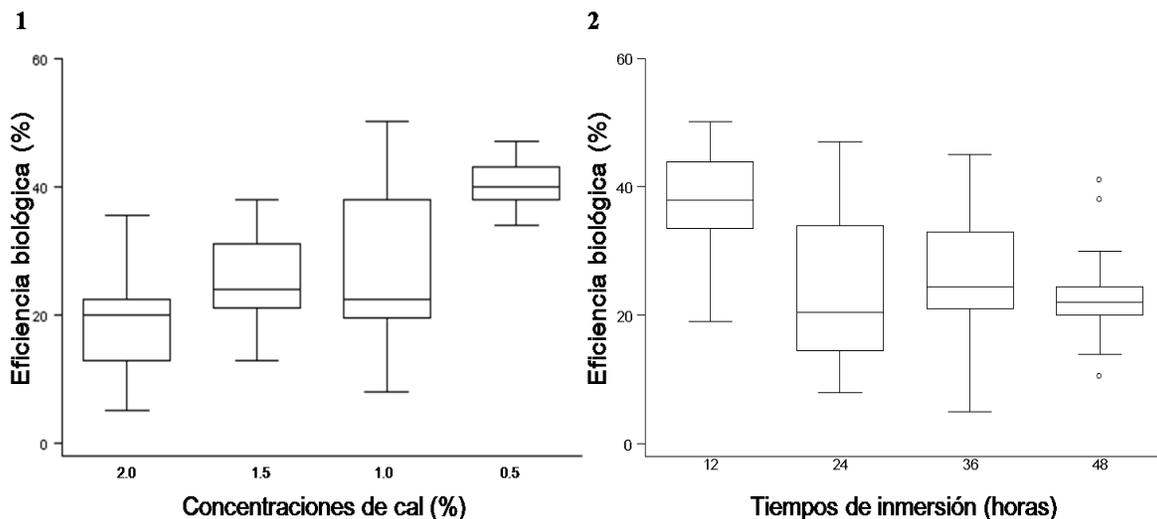
($p < 0.00001$), así como en la interacción concentración de cal y tiempos de inmersión ($p < 0.00001$) (Anexo 4).

Al comparar las concentraciones de cal (independientemente del tiempo de inmersión) se observó que la EB obtenida en la concentración de 0.5 % de cal fue significativamente mayor que la encontrada en las concentraciones 1.0 %, 1.5 % y 2.0 % de cal ($p < 0.0001$) (Gráfica 3).

Así mismo, la comparación de los tiempos de inmersión, (independientemente de la concentración de cal) indicó que la inmersión del sustrato durante 12 horas presentó EB significativamente mayor que la obtenida en la inmersión del sustrato durante 24 horas ($p < 0.0001$), 36 horas ($p = 0.006$) y 48 horas ($p < 0.0001$) (Gráfica 3).

En conclusión, para el cultivo de *P. ostreatus* en sustratos desinfectados en agua alcalina, se puede decir que en la concentración de 0.5 % de cal y 12 horas de tiempo de inmersión se obtuvieron EB relativamente mayores que los demás tratamientos.

Gráfica 3. Eficiencia biológica de la cepa *P. ostreatus* 152.2005, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.



1. La EB obtenida fue mayor en la concentración de cal 0.5 %. 2. La EB observada fue mayor a las 12 horas de inmersión.

Respecto a la Tasa de Producción (TP) de *P.ostreatus* 152.2005, se observó que a las 12 horas de inmersión del sustrato, la mayor TP se obtuvo en la concentración 0.5 % de cal (0.96), y la menor con 2.0 % de cal (0.46). A las 24 horas de inmersión, la mayor TP se observó con 0.5 % de cal (0.84) y la menor con 2.0 % de cal (0.20). A las 36 horas de inmersión del sustrato, la mayor TP se alcanzó en la concentración 0.5 % de cal (0.79) y la menor con 2.0 % de cal (0.25). De igual manera, a las 48 horas de inmersión del sustrato la mayor TP se encontró en la concentración 0.5 % de cal (0.61), en tanto que la menor en la concentración 2.0 % de cal (0.23) (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de producción de la cepa *P. ostreatus* 152.2005, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (horas)	Concentración de cal (%)	Valor del pH del sustrato	Tasa de Producción \pm DS (EB/día) ¹
12	0.5	10.15	0.96 \pm 0.14*
	1.0	10.80	0.86 \pm 0.15
	1.5	11.25	0.68 \pm 0.10
	2.0	11.70	0.46 \pm 0.08
24	0.5	10.35	0.84 \pm 0.24*
	1.0	11.35	0.36 \pm 0.13
	1.5	11.54	0.33 \pm 0.11
	2.0	11.75	0.20 \pm 0.05
36	0.5	10.48	0.79 \pm 0.13*
	1.0	11.50	0.41 \pm 0.12
	1.5	11.60	0.34 \pm 0.10
	2.0	11.78	0.25 \pm 0.24
48	0.5	10.57	0.61 \pm 0.19*
	1.0	11.58	0.32 \pm 0.07
	1.5	11.64	0.32 \pm 0.06
	2.0	11.90	0.23 \pm 0.07

¹Los valores representan la media y desviación estándar obtenidas en cinco réplicas.

*Los datos en negritas indican la mayor Tasa de Producción obtenida.

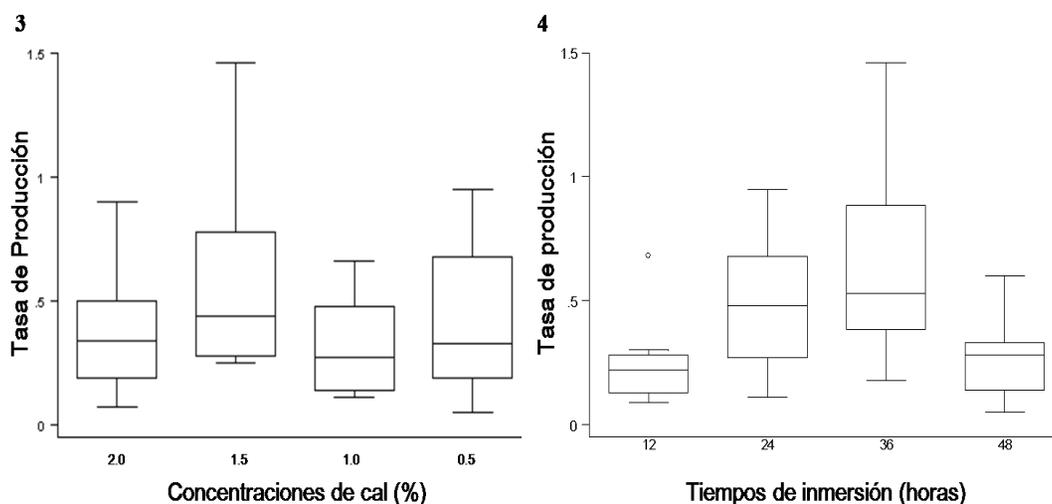
El análisis comparativo para la TP de la cepa *P. ostreatus* indicó diferencia significativa entre concentraciones de cal ($p < 0.00001$), entre tiempos de inmersión ($p < 0.00001$), así como interacción concentración-tiempo ($p < 0.0471$) (Anexo 5).

Al comparar las concentraciones de cal (independientemente del tiempo de inmersión del sustrato) se observó que la TP obtenida en la concentración 0.5 % de cal fue

significativamente mayor que la encontrada en las concentraciones 1.0 %, 1.5 % y 2.0 % de cal ($p=0.0001$). Así también la TP encontrada en la concentración de 1.0 % de cal fue significativamente mayor que la obtenida en la concentración 2.0 % de cal ($p= 0.021$) (Gráfica 4).

La comparación de los tiempos de inmersión (independientemente de la concentración de cal) indicó que la inmersión del sustrato durante 12 horas, presentó una TP significativamente mayor que la obtenida en la inmersión del sustrato durante 24 horas ($p<0.002$), 36 horas ($p<0.003$) y 48 horas ($p<0.0001$) (Gráfica 4).

Gráfica 4. Tasa de Producción de la cepa *P. ostreatus* 152.2005, cultivada en sustratos desinfectados por diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.



1. La TP obtenida fue mayor en la concentración de cal 0.5 %. 2. La TP observada fue mayor a las 12 horas de inmersión.

En resumen los resultados de EB y TP de la cepa *P. ostreatus* 152.2005 cultivadas sobre sustratos desinfectados con agua alcalina indican que la mejor combinación de concentración de cal y tiempo de inmersión fue de 0.5 % de cal y 12 horas de inmersión (Gráficas 3 y 4).

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el crecimiento de dos cepas nativas de *Pleurotus* a través de la producción de cuerpos fructíferos cultivados sobre sustratos desinfectados con agua alcalina en diferentes concentraciones de cal y tiempos de inmersión.

La capacidad de desinfección del sustrato por medio de cal se debe a que al incrementarse el porcentaje de ésta, el pH de la suspensión aumenta (en este estudio el pH estuvo entre 10 y 12). La efectividad de la técnica se debe a que la mayoría de los contaminantes que se encuentran en el sustrato son sensibles a valores altos de pH, en tanto que *Pleurotus* tiene la capacidad de tolerarlos, de manera que al preparar el sustrato se prefieren valores más elevados que los establecidos como óptimos para este género, los cuales se han señalado entre pH 5 - 6 (3).

En este estudio se encontró que, para el cultivo de la cepa *P. levis* 107.2001, la concentración de cal más eficiente fue 1.5 %, lo cual sería un indicador que la desinfección del sustrato fue adecuada y que el micelio de la cepa de *P. levis* toleró apropiadamente el pH alcanzado a esta concentración.

Así mismo, tomando en consideración que la EB alcanzada en la concentración de 2.0 % de cal fue inferior a la obtenida en 1.5 %, pero mayor a la encontrada en 0.5 %, se puede inferir que el crecimiento del micelio se ve afectado en valores de pH cercanos a 12; por otra parte, la concentración de 0.5 % no desinfecta apropiadamente el sustrato, de manera que los microorganismos contaminantes ejercen competencia en la degradación, lo que se refleja en la EB baja.

Existe una aparente discrepancia con los resultados obtenidos en la concentración de 1.0 % de cal, donde la cepa *P. levis* 107.2001 mostró los valores de EB más bajos. Esta disminución de la productividad no se debió a una desinfección poco eficiente, sino probablemente a que los tratamientos estuvieron ubicados en un lugar dentro del módulo de fructificación donde la temperatura, la humedad o ventilación no fueran las mejores, afectando así la producción de basidiomas (3).

En cuanto al tiempo de inmersión del sustrato para el cultivo de la cepa *P. levis* 107.2001, se observó una tendencia general en la cual los valores de EB y TP fueron bajos a las 12 y 48 horas, en tanto que se incrementaron a las 24 y 36 horas. Esto puede ser debido que a las 12 horas, independientemente de la concentración de cal, la desinfección no es del todo eficiente, en tanto que a las 48 horas el pH del medio empieza a afectar el crecimiento del hongo. Por tal razón puede inferirse que la desinfección comienza a ser efectiva a las 24 horas, completando su acción a las 36 horas.

Respecto a la productividad de *P. levis*, no se encontró ningún estudio donde se evaluara la EB con la técnica de desinfección en agua alcalina. Sin embargo, se ha reportado que la cepa mexicana CP 30, cultivada sobre sustrato de paja de *Digitaria decumbens* (70%) y pulpa de café (30%) produjo una EB de 71.34% (48). Este valor de EB es superior al máximo encontrado en esta investigación (48.20 %).

En conclusión, se puede indicar que para obtener los mejores valores de EB y TP para la cepa *P. levis* 107.2001, cultivada en condiciones rurales, la mejor combinación es desinfectar el sustrato con una concentración de 1.5% de cal durante 36 horas de inmersión.

Para el cultivo de la cepa *P. ostreatus* 152. 2005, se observó que a mayor concentración de cal (y por consiguiente de pH), los valores de EB y TP disminuyen. La mayor EB y TP fue encontrada a una concentración de cal de 0.5%, en tanto que los menores valores se obtuvieron a una concentración de 2.0%. Estas observaciones indican que probablemente el micelio de esta cepa es susceptible a los valores de pH alcalinos, debido que este factor influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas, afectando así el metabolismo y por lo tanto el crecimiento del hongo (3).

Así mismo, se demostró que el aumento del tiempo de inmersión del sustrato disminuye los valores de EB y TP. Este comportamiento indica nuevamente que la cepa *P. ostreatus* 152.2005 es susceptible a valores elevados de pH, como se mencionara

anteriormente. Por lo tanto a mayor tiempo de inmersión del sustrato, el crecimiento de los cuerpos fructíferos disminuye.

En conclusión, la mejor combinación entre concentración de cal y tiempo de inmersión para desinfectar el sustrato para cultivar *P. ostreatus* 152. 2005 correspondió a la concentración de 0.5% de cal y 12 horas de inmersión.

Los resultados de esta investigación coincidieron con lo reportado para esta especie en dos estudios llevados a cabo en México utilizando la misma técnica de desinfección del sustrato, donde la mayor EB se encontró en la concentración de cal de 0.5%. Sin embargo, en dichos estudios el mejor tiempo de inmersión fue de 48 horas, en tanto que lo reportado en este trabajo fue de 12 horas (44, 45).

Adicionalmente, los valores de EB obtenidos en los estudios mencionados fueron mayores a lo reportado en esta investigación, ya que la EB estuvo entre 52-83% cuando se cultivó en olote y caña de maíz (44, 45). Asimismo, en un estudio donde se cuantificó el cultivo de *P. ostreatus* en módulos rurales de Chiapas, México, la EB se estimó en 67% (47). Igualmente en otro estudio se informó que la EB obtenida con una cepa de *P. pulmonarius* fue de 120 % utilizando una concentración de 2.0 % de cal durante 24 horas de inmersión (46). Por lo tanto es importante realizar otros estudios donde se prueben nuevos sustratos o adicionar suplementos para mejorar la producción de cuerpos fructíferos.

En síntesis, la técnica de inmersión alcalina permitió verificar la utilidad de la misma en el cultivo de estas cepas y de presentar ventajas sobre otros métodos de desinfección del sustrato, ya que no requiere de un alto costo ni tecnología sofisticada para su realización, características que la hacen adaptable a los productores que se dedican al cultivo de *Pleurotus* a pequeña escala en áreas rurales del país.

Puesto que las dos cepas cultivadas evidenciaron EB y TP mayores en por lo menos una concentración de cal y un tiempo de inmersión se acepta la hipótesis planteada.

Finalmente tal como se observó en este estudio, cada cepa requiere diferentes factores para su adecuado crecimiento, por lo tanto es necesario realizar estudios utilizando la técnica de inmersión en agua alcalina para la desinfección del sustrato, para conocer el comportamiento de otras cepas cultivadas por los productores de hongos de nuestro país y de esta forma encontrar la concentración de cal y tiempo de inmersión más apropiados para su cultivo en condiciones rurales específicas.

IX. CONCLUSIONES

1. La mejor eficiencia biológica y tasa de producción para la cepa *P. levis* 107.2001 fue de 48.20 % y 1.10 respectivamente a una concentración de 1.5% de cal y 36 horas de tiempo de inmersión.
2. La mejor eficiencia biológica y tasa de producción para la cepa *P. ostreatus* 152.2005 fue de 42.0 % y 0.96 respectivamente a una concentración de 0.5% de cal y 12 horas de tiempo de inmersión.
3. La técnica de inmersión en agua alcalina para el sustrato a base de olote y rastrojo de maíz es eficiente como técnica de desinfección para la producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* en condiciones artesanales considerándose de bajo costo.

X. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la producción de cuerpos fructíferos de otras cepas de *Pleurotus* spp sobre sustratos diferentes utilizando la técnica de desinfección por inmersión en agua alcalina.
2. Se recomienda realizar más estudios con las cepas de *P. ostreatus* 152.02005 y *P. levis* 107.2001, utilizando esta misma técnica de desinfección pero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, para evaluar su productividad.
3. Realizar investigaciones encaminadas a la estandarización de las condiciones óptimas de los módulos artesanales para mejorar la producción de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.

XI. REFERENCIAS

1. Villee C.A. Reino Fungi En Biología. Nueva Editorial Interamericana 1996. 719p. 16p.
2. Mueller G. *et al.* Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods Elsevier Academia Press. USA 2004. 777p. p1-5.
3. Sánchez, J. Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En: La Biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Sánchez, J., Royse, D. (Eds). 1^a ed. Editorial LIMUSA. S. A. de C. V., México, 2001. 294p. p45-46.
4. Sommerkamp, Y. Hongos de Guatemala, II. Especies depositadas en el herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Rev Mex Mic 1990; 6: 179-197.
5. García R., M. *Pleurotus ostreatus* su importancia y tecnología de cultivo En: Cultivo industrial de *Pleurotus ostreatus*. Disponible en <http://www.ucf.edu.cu/publicaciones/anuario2002/NTIC/articulo8.pdf>.
6. Pérez, R, Mata G. 2005 Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonaris* en viruta de pino: Rev Mex Mic 2005; 53-59.
7. Gallardo, J.M. Cultivo de hongo comestible 2008: Disponible en : <http://www.lagirgola.com.ar>
8. Deschamps, R. J. Producción y comercialización de hongos comestibles. 1era. ed. Eds. Gral Rivas, Buenos Aires, Argentina 2003. 1-3.
9. Vallée, S. J. Los hongos. Elementos de su historia Bueno Aires 2006: Disponible en: <http://www.ambiente-ecologico.com/revist52/hongos52.htm>
10. Martínez Z. M. A cerca de los hongos II En Introducción y aprovechamiento de las setas silvestres Febrero 2005. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/Hongos.htm>.
11. Landerecker, E. Fundamentals of the fungi. 3th.ed. USA: Prentice-Hall, 1990. 171-213, 275-303.
12. Martínez-Carrera, D. *et al.* México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. Eds. ECOSUR-CONACYT, México 2007; p236. p209-211.
13. Oresanz, J.V. y Navarro. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre madera. En cultivo industrial de setas. Disponible en: <http://www.infoagro.com/htm>.

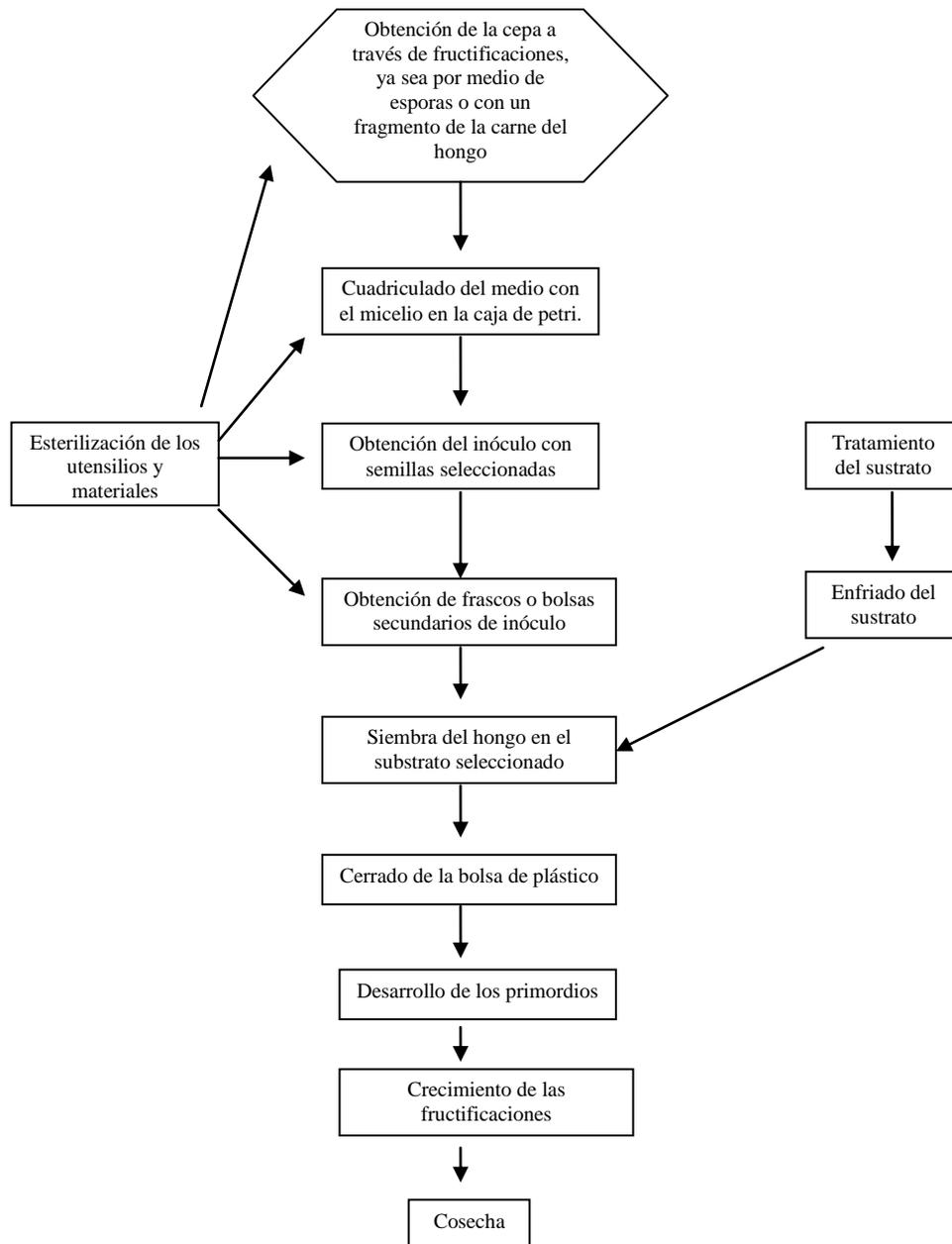
14. Stamets, P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. USA Ten Speed Press, 1993.554p. p283, 326.
15. Alexopoulos, C. Introductory mycology. 2 ed. USA: John Wiley and Sons Inc. 1996. 896p. p3-9.
16. Herrera, T.; Ulloa, M. El reino de los hongos. México: UNAM, Fondo de Cultura Económica, 1998. p512. p426-430.
17. Ruth de León-Chocoj. Gastón Guzmán. Daniel Martínez-Carrera. Planta productora de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* en Guatemala. Rev Mex Mic 1988; 4: 297-301.
18. De León R. El cultivo de *Pleurotus* spp. Y buenas prácticas de manejo para la producción de cuerpos fructíferos inocuos. En El cultivo de setas *Pleurotus* spp en México. Eds. ECOSUR-CONACYT, México 2007; p236 p177-183.
19. Argueta, J. Estudios de los macromicetos de la ciudad de Guatemala, Mixco y San Juan Sacatepequez. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. p 86.
20. Phillips, R. Mushrooms of North America. USA: Little, Brown and Company, 1991. p 206. p87
21. Singer, R. The Agaricales in modern taxonomy. 13th. ed. Chicago III. J. Cramer, 1975. p912. p181-184.
22. Index fungorum. Clasificación taxonómica. Septiembre 2007. Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/Names/synspecies.asp?RecordID=174220>.
23. Griffin, D. Ecology of soil fungi. USA: John Wiley and Sons 1972. 28-43.
24. Sánchez, J. Crecimiento y fructificación. En: La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez, J., Royse, D. (Eds). 1^a ed. Editorial LIMUSA. S. A. de C. V., México, 2001. 294p. p49-66.
25. Guzmán, G. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. 2ed. México: Limusa, 1990. p316 p108, 121-122.
26. Chacón, S., Col. Guía ilustrada de los hongos del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de Xalapa, Veracruz y Áreas Circunvecinas. México. Instituto de Ecología. 1995. 48-49.

27. Pérez R. B., Descripción de las características macroscópicas, de cultivo *in vitro* de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. p 6-14.
28. López R. A. y García J. *Pleurotus levis* (Berk. & Curt.) Singer. Mayo 2006 Disponible en: <http://fp.bio.utk.edu/mycology/P/euroius/pleurotusisg.html>.
29. López R. A. y García J. Estructura del pleuroma de *Pleurotus*. Mayo 2006. Disponible en: <http://fp.bio.utk.edu/mycology/P/euroius/pleurotusisg.html>.
30. Cojtí, B. Cultivo de una cepa nativa de *Pleurocybella porrigens* para la producción de cuerpos fructíferos in Vitro. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 5-8.
31. Guzmán, G. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos de México. (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). La Diversidad Biológica de Iberoamérica II. Volumen Especial, Acta Zoológica Mexicana, nueva serie. 1998; 377. 111-175.
32. Sanchez, J. Crecimiento y fructificación. En: Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Ed. LIMUSA, S.A. México. 2001. 294 p. p59.
33. Rinyer, D. _El substrato “gastado” de los hongos: cómo se está manipulando y utilizando en el mundo 2003. 3-4. Disponible en: <http://setascultivadas.com/2004articulofebrero.html>
34. Cisterna L. C. Cultivo de hongos. Noviembre 2008. Disponible en: http://www.micotec.cl/cultivo_de_hongos_exótico.pdf.
35. Morcillo, M., Sánchez M. Cultivo de setas y desarrollo rural en Nicaragua Mayo 2005. Disponible en: http://www.micofora.com/pubdocs/articulos_6.pdf.
36. García A. O. Situación actual de los hongos comestibles en la Argentina y en el mundo. Manual para la producción y comercialización de hongos comestibles. 2006. 13-15.
37. Muez M. A., Nuñez J. La preparación del sustrato. En: La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez, J., Royse, D. (Eds). 1 ed. Editorial LIMUSA. S. A. de C. V., México, 2001. 294p. p159-179.
38. Sánchez, J., Royse D. El cultivo de *Pleurotus* spp. En: La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez, J., Royse, D. (Eds). 1 ed. Editorial LIMUSA. S. A. de C. V., México, 2001. 294p. p187-201.

39. Sobal. M. Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio. *Micol Neotrop Apl* 1989; 2: 19-39.
40. Salmenes, D. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento miceliario y productividad. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 173-176.
41. Cisterna L. C. Esterilización vs. pasteurización de sustratos de cultivo. Julio 2004. Disponible en: <http://www.micotec.cl/Pasteurización-vs-Esterilización.pdf>.
42. Cisterna L. C. Métodos de optimización de producción de hongos benéficos. Disponible en: <http://www.micotec.cl/métodosdeoptimizacióndeproduccióndehongosbenéficos>
43. López, A. García, J. Cómo cultivar hongos comestibles? Manual de producción de hongos *Pleurotus ostreatus*. México 2008. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/38170/ETAPAS-DEL-CULTIVO-DE-LOS-HONGOS-COMESTIBLES-EN-MEXICO>
44. Contreras, E., Sokolov, M., Mejía G., Sánchez, J. Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *J Hort Sci Biotech* 2003; 79 (2): 234-240.
45. Cofiño F., Jiménez L., Sanchez J. and Royse D. *Digitaria decumbens* grass substrate prepared by alkaline immersion for culture of *Pleurotus* spp. *Science and cultivation of edible and medicinal fungi/ Romaine, Keil, Eds* 2004.
46. Bernabé-González T. y Cayetano-Catarino M. Cultivation of *Pleurotus pulmonarius* on substrate treated by immersion in alkaline water in Guerrero, Mexico. *Micol Apl Int* 2009; 21(1):19-23.
47. De León Monzón, J. H. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* de los Altos de Chiapas, México. *Rev Mex Mic* 2004; 18: 31-38.
48. Martínez-Carrera D., Sánchez J. E., Leal-Lara H. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales. *Rev Mex Mic* 2009; 30: 31-42.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama general para el cultivo de *Pleurotus* spp (38).



Anexo 2. Análisis de varianza de la Eficiencia Biológica de *P.levis* cultivados sobre sustratos desinfectados en agua alcalina

Origen	Suma de Cuadrados	DF	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	7691.14171	15	512.742781	15.06	0.0000
Concentración de cal	1787.14883	3	595.716275	17.49	0.0000
Tiempo de inmersión	2505.52309	3	835.174364	24.52	0.0000
Intercepto	3465.85594	9	385.095105	11.31	0.0000
Error	1838.952	54	34.0546667		
Total	9530.09371	69	138.1173		

R Cuadrado = 0.8070 (Ajuste R Cuadrado = 0.7534)

Anexo 3. Análisis de varianza de la Tasa de Producción de *P.levis* cultivados sobre sustratos desinfectados en agua alcalina

Origen	Suma de Cuadrados	DF	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	4.87066457	15	0.32471097	15.69	0.0000
Concentración de cal	0.80411989	3	0.26803996	12.96	0.0000
Tiempo de inmersión	1.90825941	3	0.63608647	30.74	0.0000
Intercepto	2.19321408	9	0.24369045	11.78	0.0000
Error	1.11723825	54	0.02068959		
Total	5.98790282	69	0.0867812		

R Cuadrado = 0.8134 (Ajuste R Cuadrado = 0.7616)

Anexo 4. Análisis de varianza de la Eficiencia Biológica de *P.ostreatus* cultivados sobre sustratos desinfectados en agua alcalina.

Origen	Suma de Cuadrados	DF	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	7997.82984	15	533.188656	19.32	0.0000
Concentración de cal	3934.9953	3	1311.6651	47.52	0.0000
Tiempo de inmersión	2683.55332	3	894.517773	32.41	0.0000
Intercepto	1379.28122	9	153.253469	5.55	0.0000
Error	1766.63942	64	27.6037409		
Total					

R Cuadrado = 0.8191 (Ajuste R Cuadrado = 0.7767)

Anexo 5. Análisis de varianza de la Tasa de Producción de *P.ostreatus* cultivados sobre sustratos desinfectados en agua alcalina

Origen	Suma de Cuadrados	DF	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	4.78543502	15	0.319029	19.84	0.0000
Concentración de cal	2.86094497	3	0.95364833	59.29	0.0000
Tiempo de inmersión	1.62704504	3	0.54234835	33.72	0.0000
Intercepto	0.29744501	9	0.03304945	2.05	0.0471
Error	1.02932004	64	0.01608312		
Total	5.81475506	79	0.07360449		

R Cuadrado = 0.8230 (Ajuste R Cuadrado = 0.7815)