

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Maestría en Manejo de Ecosistemas de Zonas Áridas



“APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL
CULTIVO DE *PLEUROTUS ERYNGII* EN ENSENADA B.C Y EL
MODELADO DE SU PRODUCCIÓN”

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

FLOR DE LIZ GUERRERO SANDERS

Ensenada, Baja California. Agosto, 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

**"APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL CULTIVO
DE PLEUROTUS ERYNGII EN ENSENADA B.C Y EL MODELADO DE SU
PRODUCCIÓN"**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

FLOR DE LIZ GUERRERO SANDERS

Aprobada por:



Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez

Directora



M.C. Bernardino Ricardo Eaton González

Sinodal



Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el período 2012-2014.

A mi comité de tesis, la Doctora Nahara Ayala, por su confianza puesta en mí para el desarrollo de esta tesis y por todas esas palabras de ánimo, al Maestro Ricardo Eaton por todos sus argumentos más que acertados y ayuda en gran parte de la tesis y al Doctor Heriberto Hernández por aceptar ser parte de este proyecto, por su ayuda para la caracterización de las muestras y su disponibilidad.

A la empresa “Setas de Baja California S de R.L. de C.V” por toda la confianza y facilidades otorgadas para la realización de esta tesis y a Edgar Oliva.

A la M.C Eva Águila Almanza de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por su ayuda en la caracterización de las muestras.

Al Dr. Efraín Rosas coordinador de Área de Laboratorios e Investigación Aplicada/ Laboratorio de Caracterización de Materiales en el Centro Universitario de Vinculación y Trasferencia de Tecnología OTC-BUAP y a los técnicos M.C Ricardo Agustín Serrano y a la Bióloga Carla de la Cerna Hernández por ayudarme a procesar las muestras.

Al Lic. Reynaldo Magaña y a la SAGARPA por los datos brindados.

A todos mis maestros de MEZA por compartir su conocimiento y estar siempre disponibles para cualquier duda o comentario.

A mis compañeros y amigos de generación Carlos, Hugo, Vivi, Gaby, Lalo, Martha, Lluvia, Vero, Linda, Shell, Rafa, Mike, Franco y Eunice por hacer de estos más de dos años una grata experiencia.

A Alfredo Ríos, Oscar Jiménez y Marco García por todas sus aportaciones.

Al personal del almacén de la FC y bibliotecarios por todas las facilidades brindadas.

A mis padres y hermanas por siempre estar apoyándome en todo lo que desee hacer.

A Jesús Villaseñor, gracias por todo tu apoyo invaluable en toda esta etapa.

Y por último a todos los que directa e indirectamente participaron en la elaboración de esta tesis con sus comentarios, sus palabras de ánimo, las desveladas grupales, etc.

Muchas Gracias.

RESUMEN

México es un país donde la agricultura es una de las actividades de mayor importancia, derivado de esto se generan grandes cantidades de desechos agrícolas los cuales no siempre se disponen de la mejor manera ya que algunos esquilmos, rastrojos, virutas, etc., son colocados al aire libre provocando así su descomposición creando focos de infección y generalmente la quema de estos materiales ocasiona emisiones de gases a la atmosfera. Algunos de estos desechos agrícolas pueden ser utilizados para la producción de hongos comestibles, por lo que los objetivos principales fueron determinar los substratos agroindustriales de Baja California más convenientes para el cultivo de *Pleurotus eryngii* y el modelado de su producción. También se determinaron los medios idóneos para producir micelio primario y secundario (blanco) en donde el mejor medio de cultivo fue el agar de dextrosa y papa (PDA) con un crecimiento micelial de 16.21 mm en siete días con un promedio de 2.32 mm/día. Para producir el blanco la mejor semilla fue el trigo con un crecimiento micelial de 38.75 mm y promedio de 6.46 mm/día requiriendo de seis días para completar su desarrollo a través del tratamiento con 24 h de inmersión en agua y 10 minutos de cocción. Para el micelio terciario se eligieron nueve substratos de los cuales el rastrojo de chícharo alcanzó su máximo desarrollo en ocho días, mientras que la fibra de coco, la fibra de yuca y la paja de trigo requirieron de catorce días mientras que la cascarilla de algodón necesitó 16 días para su colonización. Estos substratos fueron caracterizados físicamente mediante técnicas de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de barrido. Se realizaron cinco réplicas en bolsas de paja de trigo con 3 kg de peso húmedo requiriendo de 300 g de inóculo por cada bolsa. Se obtuvo en eficiencia biológica de 65.56% y un rendimiento de 39.33%. También se desarrolló un modelo de simulación para la producción de *P.eryngii* en el programa STELLA 7 donde se ilustra de manera conceptual las entradas y salidas del proceso de cultivo de hongos en general, así como las variables que lo alimentan. Muestra los resultados del proceso en diferentes interfases para el usuario: cultivo, contaminación y producción, desplegando información en graficas o tablas. En la interfase de cultivo muestra el total de kg de hongos, la incubación y producción, en la interfase de contaminación presenta los kg de substrato perdido por manejo y kg contaminados y en la interfase de producción se observa los kg de substrato colonizado y la producción en kg de hongos.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN.....	II
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. ANTECEDENTES	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	7
1.4. OBJETIVOS	8
CAPÍTULO II	9
2. METODOLOGÍA	9
2.1. Determinar las condiciones del crecimiento y medio idóneo para su desarrollo micelial primario.....	9
2.2. Determinar las condiciones y el medio idóneo para el desarrollo de su crecimiento micelial secundario.	12
2.3. Determinar las condiciones del crecimiento y el substrato idóneo para el desarrollo micelial terciario.....	15
2.3.1. Selección de distintos substratos para el desarrollo del hongo.....	15
2.3.2. Pasteurización de los substratos.....	17
2.4. Técnicas para caracterizar los substratos más adecuados para la producción de basidiomas de <i>P. eryngii</i>	20
2.4.1. Espectroscopia infrarroja (FT-IR).....	20
2.4.3. Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	22
2.5. Determinación de los substratos más adecuados para la producción de basidiomas de <i>P. eryngii</i>	22
2.5.1. Siembra del hongo.....	22
2.5.2. Expansión micelial.....	23
2.5.3. Eficiencia biológica.....	23
2.5.4. Rendimiento.....	23
2.6. Desarrollar un modelo de simulación para el proceso de producción de <i>Pleurotus eryngii</i>	23
2.7. Corroboración de la especie por biología molecular.....	26
2.7.1. Secuenciación y corroboración por análisis moleculares.....	26

CAPÍTULO III	28
3. RESULTADOS	28
3.1. Crecimiento micelial primario.	28
3.2. Crecimiento micelial secundario.	31
3.3. Crecimiento micelial terciario.....	37
3.4. Caracterización física de substratos.	45
3.4.1. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR).....	45
3.4.2. Difracción de rayos X (DRX)	46
3.4.3. Microscopia Electrónica de Barrido.....	48
3.5. Determinación de los substratos más adecuados para la producción de basidiomas de <i>P. eryngii</i>	51
3.5.1. Eficiencia biológica y rendimiento.	51
3.6. Modelo de simulación para la producción de <i>Pleurotus eryngii</i>	52
3.7. Análisis molecular de la especie.....	59
3.7.1. Secuencia genética obtenida	59
CAPÍTULO IV	61
4. DISCUSIÓN.....	61
5. CONCLUSIONES	70
6. RECOMENDACIONES.....	71
7. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cepa de <i>Pleurotus eryngii</i> utilizada para replicar.....	10
Figura 2: Medio de cultivo preparado.....	10
Figura 3: Área de trabajo.....	11
Figura 4: Cajas Petri inoculadas en incubadora a 25°C.....	11
Figura 5: Medios de cultivo utilizados.....	11
Figura 6: Granos de alpiste, mijo blanco, mijo rojo y trigo en remojo por 12 y 24 horas con yeso al 3%.....	13
Figura 7: Cocción de los distintos granos.....	13
Figura 8: Granos con 12 y 24 h de inmersión en agua extendidos en papel periódico por 24 horas.....	14
Figura 9: Grano de trigo inoculado.....	14
Figura 10: Cajas Petri en incubadora a 25°C.....	14
Figura 11: Fibra de coco y fibra de yuca en remojo por 24 horas.....	18
Figura 12: Bagazo de tomate escurriéndose en fase anaerobia por 24 horas.....	18
Figura 13: Substratos en agua con yeso al 3% a 80°C por cuatro horas.....	19
Figura 14: Semilla de trigo lista para ser transferida.....	19
Figura 15: Cajas Petri inoculadas empleando como substrato madera de vid.....	20
Figura 16: Espectrofotómetro.....	21
Figura 17: Difractómetro de rayos X.....	21
Figura 18: Microscopio electrónico de barrido.....	22
Figura 19: Crecimiento micelial primario en distintos medios de cultivo.....	29
Figura 20: Crecimiento micelial primario en medio de cultivo: A) Agar de Dextrosa y Papa, B) Agar Extracto de Malta, C) Agar Harina de Maíz y D) Agar Dextrosa Sabouraud.....	30
Figura 21: Crecimiento micelial secundario en granos de trigo con el tratamiento de 12 h de remojo. c/c: con cocción; s/c: sin cocción.....	31
Figura 22: Crecimiento micelial secundario en distintos granos con el tratamiento de 24 h de remojo. C/C: con cocción.....	32
Figura 23: Crecimiento micelial secundario en distintos granos con el tratamiento de 24 h de remojo. S/C: sin cocción.....	32
Figura 24: Grano de Trigo: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.....	33
Figura 25: Grano de Alpiste: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.....	34
Figura 26: Grano de Mijo blanco: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.....	35
Figura 27: Grano de Mijo rojo: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.....	36
Figura 28: Crecimiento micelial terciario en distintos substratos: MA: malta agotada; RC: rastrojo de chícharo; BA: bagazo de algas; BT: bagazo de tomate; FC: fibra de coco; FY: fibra de yuca; PT: paja de trigo; VM: vid molida y CA: cascarilla de algodón.....	37
Figura 29: Crecimiento micelial terciario en rastrojo de chícharo.....	38
Figura 30: Crecimiento micelial terciario en bagazo de tomate.....	39
Figura 31: Crecimiento micelial terciario en fibra coco.....	39
Figura 32: Crecimiento micelial terciario en fibra de yuca.....	40
Figura 33: Crecimiento micelial terciario en paja de trigo.....	40
Figura 34: Crecimiento micelial terciario en cascarilla de algodón.....	41

Figura 35: Crecimiento micelial terciario en bagazo de algas.....	41
Figura 36: Crecimiento micelial terciario en vid molida.....	42
Figura 37: Fibra de yuca con algunos primordios a los 35 días de ser inoculado.....	42
Figura 38: Fibra de coco con algunos primordios a los 35 días de ser inoculado.....	43
Figura 39: Fibra de coco con primordio.....	43
Figura 40: Fibra de yuca con primordios.....	44
Figura 41: Bagazo de algas contaminado con <i>Aspergillus spp.</i>	44
Figura 42: Espectros infrarrojos de los substratos utilizados: cascarilla de algodón, fibra de coco, fibra de yuca, paja de trigo y rastrojo de chícharo.....	46
Figura 43: Difractograma de los substratos utilizados: cascarilla de algodón, fibra de coco, fibra de yuca, paja de trigo y rastrojo de chícharo.....	48
Figura 44: Fibra de coco vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x.....	49
Figura 45: Fibra de yuca vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x, presentando cristales marcados con círculos rojos.....	50
Figura 46: Cascarilla de algodón vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x.....	50
Figura 47: Primeros cuerpos fructíferos de <i>P. eryngii</i> a los 25 días.....	51
Figura 48: Producción de carpóforos en paja de trigo.....	52
Figura 49: Componentes del modelo.....	53
Figura 50: Fórmulas aplicadas al modelo.....	54
Figura 51: Pantalla 1: Interacción del usuario. Tomado de Eaton (2014).....	55
Figura 52: Pantalla 2: Controles de cultivo. Tomado de Eaton (2014).....	56
Figura 53: Interfase de cultivo.....	57
Figura 54: Interfase de contaminación.....	57
Figura 55: Interfase de contaminación comparativa.....	58
Figura 56: Interfase de producción.....	58
Figura 57: Listado de secuencias.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Granos utilizados para la propagación de micelio secundario.....	12
Tabla 2: Substratos seleccionados para la propagación de micelio terciario.....	16
Tabla 3: Substratos utilizados y réplicas realizadas.....	17
Tabla 4: Etapas del proceso de producción de <i>Pleurotus eryngii</i> representadas en el modelo.....	25
Tabla 5: Lista de indicadores y variables base que alimentan el modelo conceptual.....	25
Tabla 6: Variables que alimentan el modelo cuantitativo.....	

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La falta de alimentos nutritivos de bajo costo es un problema crítico en México, por lo que producir alimentos económicos puede contribuir a solucionar esta situación. Una de las alternativas es el cultivo de hongos comestibles, ya que se tiene identificado que estos organismos cuentan con un alto valor nutrimental y propiedades medicinales por lo que pueden ser inclusive un alimento nutracéutico.

Pleurotus eryngii (DC.:Fr.) Quél., comúnmente conocido como “rey ostra” o “seta de cardo”, es un hongo comestible reconocido como el mejor de todas las especies del género *Pleurotus* por su excelente consistencia del píleo y estípite, agradable aroma y excelentes cualidades culinarias (Gaitán-Hernández, 2005 y Andrino *et al.*, 2011). Por lo que el interés en su producción se asocia a lo anteriormente expuesto, factibilidad de producción en substratos de bajo costo, y a sus características farmacéuticas.

Como substratos de bajo costo para el cultivo de hongos, se cuenta con el uso de los subproductos agroalimentarios y se basa en el concepto de ecosistemas industriales (Pongrácz, 2004), que plantea una simbiosis entre industrias y que toman el modelo de ciclos cerrados de materia, donde el residuo del primero es la materia del siguiente.

Al respecto, México produce una importante cantidad de residuos agroindustriales potencialmente utilizables en la producción de hongos. En Baja California, desde 2008 y parte del año 2012, la mayor producción agrícola para el municipio de Ensenada se obtuvo en los siguientes cultivos: 817, 326 ton de jitomate, 115,340 ton de cebada y 92, 215 ton de uva (SAGARPA, 2013). De tal manera que un gran porcentaje de esta producción reportada, corresponde a residuos agrícolas como lo son los bagazos, las pajas, los rastrojos y las virutas, por mencionar algunos, residuos que al igual que la alfalfa y el trigo, pueden ser aprovechados como substratos para la producción de *P. eryngii*.

Sin embargo, a pesar del potencial de uso de residuos como sustrato para la producción de hongos, en nuestro país la investigación sobre la seta de cardo ha sido escasa, en contraste con países como China o Japón.

En la actualidad los mercados internacionales exigen productos de excelente calidad, así como suministros grandes y estables, por lo que es muy importante que se genere información técnica que contribuya al desarrollo económico regional y de la investigación en sistemas de producción agrícola (Del Carmen y Ramírez, 1997).

Por lo anterior, la presente investigación está dirigida a la determinación de los sustratos regionales más convenientes para el cultivo de *Pleurotus eryngii*, y el modelado de su producción, tomando en consideración su elevado valor nutrimental y la factibilidad *a posteriori* de introducir en la dieta de la población de Baja California un alimento de alta calidad.

La humanidad siempre ha utilizado modelos como herramientas para resolver un problema ya que proporcionan una imagen simplificada de la realidad (Marín y Delgado, 1999). Para esto es importante que el modelo contenga los rasgos característicos del sistema a modelar y que sean esenciales en el contexto u objetivo del modelo o sistema a desarrollar (Jorgensen y Bendoricchio, 2001) y se debe considerar que un modelo es una descripción y representación formal de los elementos más esenciales de un problema (Grant *et al.* 2001). Los modelos de simulación aplicados a problemas relacionados con recursos naturales se han utilizado desde hace décadas. Existen también diversos *softwares* que permiten desarrollar estos modelos, hoy en día mucho más accesibles y amigables para el usuario. Ejemplo de ello es STELLA por sus siglas en inglés, un *software* de modelado dinámico y una herramienta que brinda de forma práctica la simulación de cómo los sistemas funcionan en la realidad. Como parte de la investigación, se plantó la necesidad de explorar la actividad de cultivo de hongos a través de un modelo que represente los pasos y etapas del cultivo y sirva como herramienta de planeación y capacitación a futuros interesados en el desarrollo de esta actividad.

1.2. ANTECEDENTES

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), reportó para el 2012, que a nivel mundial 870 millones de personas en el mundo padecen de desnutrición, la mayoría de esta población vive en países en vías de desarrollo y en América Latina y en el Caribe 47 millones de personas padecen de hambre (FAO, 2013).

La malnutrición en sus diversas manifestaciones: desnutrición, carencias de micronutrientes, sobrepeso y obesidad representa una grave problemática (FAO, 2013).

Según la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) indica que para el año 2010 existían un total de 36.3% de personas en situación de pobreza y el 13.3% se encuentra en condición de indigencia (CEPAL, 2012).

Los hongos como una alternativa alimenticia.

Es en los años 80 cuando en México se propone el cultivo de hongos como una alternativa para el complemento nutricional de la población en países en desarrollo (Martínez y Guzmán, 1984). Los hongos son ricos en polisacáridos, nitrógeno, potasio y vitaminas del complejo B (Barbado, 2003). El hongo seta, es considerado como un complemento alimenticio de un aceptable valor nutricional. Sus proteínas contienen aminoácidos esenciales. Las setas son ricas en carbohidratos, vitaminas, fibras y minerales y también poseen bajo contenido de grasas (Gaitán- Hernández *et al.*, 2006). Estos hongos representan el 30% del valor nutricional comparado con otros alimentos, por ejemplo: el pollo representa el 60%, la res el 40%, la leche, el frijol, la calabaza, el maíz y las papas representan menos del 25%. El contenido de grasa es de 0.9 a 1.8% con base en su peso seco. El valor funcional y medicinal de los hongos comestibles incluye propiedades anticancerígenas, antibióticas (antimicrobianas: antivirales, antibacterianas, antiparasitarias), antioxidantes, reductoras del nivel de colesterol, cardiotónicas, antitrombóticas y antidiabéticas (Chang y Miles, 2004).

Características del hongo.

Pleurotus eryngii llamado el “rey ostra”, es un hongo que pertenece a la división Basidiomycota, de la clase Agaricomycetes, orden Agaricales, familia Pleurotaceae y género *Pleurotus*.

Básicamente tiene un sombrero de 6 a 12 cm aplanado o algo deprimido, en el centro su coloración va del crema al marrón claro o marrón oscuro con el borde enrollado. Sus láminas son desiguales, muy decurrentes, poco cerradas, claras y de color blanco grisáceo o amarillo pálido. Tiene el pie largo, cilíndrico, la mayoría de las veces excéntrico, de color blanquecino. Su carne es blanca al igual que su esporada.

Los hongos del género *Pleurotus* tienen la capacidad de degradar celulosa y lignina, presentes en diversos esquilmos agrícolas (pajas, rastrojos), desechos agroindustriales (bagazos de caña de azúcar, maguey tequilero, henequén, pulpa de café), y/o forestales (aserrín y viruta de diversas maderas) (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

La producción de hongos a nivel mundial.

El cultivo de los hongos comestibles es un sistema de bioconversión ecológica, pues lo que al hombre le es poco útil y desecha, como las pajas, bagazos, cascarillas y pulpas, los hongos lo transforman en alimento proteínico y en biomasa para venta (Ardón, 2007).

Actualmente el género *Pleurotus* ocupa el tercer lugar de los hongos cultivados a nivel mundial, después de *Agaricus* y *Lentinula*, siendo China, Japón, Corea y Tailandia los principales productores (Chang y Miles, 2004).

El cultivo empírico del género *Pleurotus* tuvo sus inicios en Alemania, alrededor de 1917. En ese entonces emplearon micelio silvestre para su inoculación en troncos. No obstante, el primer cultivo a gran escala empleando troncos como sustrato fue posible hasta 1969 en Hungría (Mora y Martínez-Carrera, 2007). A partir de ahí, el cultivo de *Pleurotus* a pequeña y gran escala se ha desarrollado rápidamente en distintas partes del mundo, particularmente en Francia, Alemania, Holanda, Italia y España, aprovechando los subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales disponibles regionalmente (Mora y Martínez-Carrera, 2007).

El cultivo de hongos en México.

En México, se producen más de 46 mil toneladas de hongos frescos, de las cuales: *Agaricus* representa el 93.7% de la producción total, *Pleurotus* el 6.3% y *Lentinula* tan sólo 0.04% (Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010). La producción de setas asciende a 4 mil toneladas al año, lo cual equivale aproximadamente al 60 por ciento de la producción total de América Latina (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

En 2007, Mora y Martínez-Carrera revisaron las investigaciones más relevantes del cultivo de setas del país, desarrolladas por el sector académico durante el periodo 1984-2006. Encontrando que dentro de los substratos empleados en México para el cultivo de *Pleurotus* destacan: el bagazo de caña de azúcar, el bagazo de maguey tequilero, la paja de cebada, la paja de trigo, la pulpa de café y el rastrojo de maíz.

Los autores encontraron 139 publicaciones sobre el género *Pleurotus* en México, ubicadas dentro de diez categorías temáticas. Una de estas categorías es la de uso de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales, en ella se encontraron 39 publicaciones de las cuales únicamente dos citan a *Pleurotus eryngii*. El primero aborda el uso de bagazo de maguey tequilero bajo el tratamiento de pasteurización, obteniendo una eficiencia biológica (EB) de 38% (Villaseñor-Ibarra *et al.*, 1998). El segundo se refiere a la utilización de paja de cebada esterilizada para la producción de la especie, reportando una EB que va de 49.57% al 57.58% (Gaitán-Hernández, 2005).

Actualmente, el género *Pleurotus* es fuente de un potencial biotecnológico muy prometedor, que abarca diversos campos de aplicación, según Cohen *et al.* (2002). Por ejemplo *P. eryngii* tiene aplicaciones ganaderas, agrícolas, industriales, médicas, y de biorremediación.

El cultivo de *Pleurotus* en Baja California.

En el caso de la región de B.C, se han dado los primeros pasos para estudiar alternativas para el reúso de algunos residuos agroindustriales para la producción de hongos comestibles, ya que al igual que en el resto del país, existe una falta de alimentos de bajo costo con altas propiedades nutricionales y medicinales. El primer estudio data de 1993, cuando Lizárraga Escobar utilizó mezclas 1:1 de los siguientes

substratos: la primera de olote y cascarilla de algodón para producir *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., consiguiendo una EB de 95%, la segunda de orujo de uva y cascarilla de algodón con un EB de 79%, y la tercera de olote y orujo de uva obteniendo una EB de 69%. Además practicó un análisis bromatológico y biométrico a los basidiomas producidos.

El segundo estudio en la región se dio en 2005, cuando Díaz Vázquez determina el comportamiento biológico de *P. ostreatus* cultivado en substrato de *Yucca schidigera* Roezl ex Ortega, en donde concluye que el uso de la fibra de *Y. schidigera* combinada 1:1 con un substrato tradicional como la paja de trigo incrementa la eficiencia biológica de esta especie.

Usos del software STELLA.

En el año 2004, Peña y Hernández publican un estudio en el que utilizan funciones matemáticas con programas de cómputo sofisticados, donde describen y analizan un modelo computacional para la emulación del crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* en una de sus primeras etapas de crecimiento, utilizando un algoritmo evolutivo con un operador genético de tipo cilíndrico. Por su parte Lamour et.al., (2001) introducen un modelo de crecimiento de un hongo que permite establecer relaciones del desarrollo del micelio bajo distintas cantidades de carbono y nitrógeno presentes en el substrato de inoculación utilizando como base de desarrollo una ecuación cúbica. En el mismo año, Laércio y Ghini presentan un modelo matemático determinístico que permitía estimar el crecimiento de la dinámica poblacional del hongo bajo diferentes dosis de fungicida aplicados a un substrato. Rowan et. al., (1999), propusieron un modelo de crecimiento basado en la dinámica de sistemas para observar el desarrollo de hongos de interior sometidos a diferentes tipos de contaminantes. En el mismo año Molina y Giannunzzi modelaron el comportamiento del hongo *Aspergillus parasiticus* considerando variables como la temperatura y la concentración de ácido propiónico en el substrato inoculado, utilizando el concepto de superficies de respuesta. Todos estos estudios involucran temas biológicos, técnicos y físicos, sin embargo ninguno de ellos relacionados con la producción o cultivo de *Pleurotus eryngii*, por lo que este estudio podría ser el primero que hace una aproximación al utilizar un modelo dinámico en esta área.

1.3. JUSTIFICACIÓN

México es un país donde la actividad agrícola es de suma importancia, derivado de estos cultivos se generan cantidades significativas de residuos lignocelulósicos mismos que pueden ser aprovechados para el cultivo de hongos comestibles, evitando así la mala disposición, y generando un producto alimenticio con alto contenido de nutrientes.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar los substratos agroindustriales de Baja California más convenientes para el cultivo de *Pleurotus eryngii* y el modelado de su producción.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el medio de cultivo idóneo para la producción de micelio primario para *P. eryngii*.
- Determinar el medio idóneo para la producción de micelio secundario para *P. eryngii*.
- Determinar el substrato más adecuado para la producción de *P. eryngii*.
- Caracterizar los substratos potenciales para el cultivo de *P. eryngii*.
- Desarrollar un modelo de cómputo del proceso de producción de *P. eryngii*.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

Los experimentos y metodologías se llevaron a cabo en el Laboratorio de Micología Aplicada en la Facultad de Ciencias de la UABC.

2.1. Determinar las condiciones del crecimiento y medio idóneo para su desarrollo micelial primario.

La cepa utilizada fue *P. eryngii* donada por la UNAM conservada en agar de dextrosa y papa (PDA) (Figura 1).

Se realizaron 10 réplicas en cajas Petri desechables estériles de 60x15 mm por cada medio de cultivo utilizado. Se preparó el medio de cultivo y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120°C a 18 lb de presión por 15 min (Figura 2). Después se dejó enfriar por un lapso de 15 a 25 min y se vació el medio de cultivo en cajas Petri, se dejó enfriar hasta que gelificó el medio y se sellaron con papel "*Parafilm*" para evitar la entrada de contaminantes. Todos los procedimientos mencionados se hicieron en condiciones totalmente asépticas.

Para la inoculación, el área de trabajo (Figura 3) fue esterilizada con dos desionizadores por un periodo de 30-45 minutos, la mesa fue limpiada con etanol y rociada con "*Lysol Aerosol Desinfectante Antibacterial*" para mantener el área libre de contaminantes, después se colocaron dos mecheros "*Fisher*" para esterilizar el área y evitar la entrada de contaminantes a las cajas Petri.

De la caja Petri con el micelio original (cepa de la UNAM), se tomaron trozos de agar de 1 cm² aproximadamente y se inocularon las cajas siguiendo todos los cuidados microbiológicos para evitar contaminación. Se sellaron las cajas con papel "*Parafilm*", se etiquetaron y se colocaron en una incubadora VWR a 25°C (Figura 4). Durante el periodo de incubación, se dio seguimiento al crecimiento micelial, para lo cual se midió la colonia fúngica cada 3 días. Se trazaron dos ejes transversales sobre la base de la caja, tomando como intersección el centro del inóculo. Una vez cubierto el medio de cultivo por el crecimiento micelial se seleccionaron las cepas que no presentaron

contaminantes y fueron colocadas en refrigeración a 4°C. El parámetro a medir fue la velocidad de crecimiento. A esta expansión micelial se le llamó fase 1 (F1).

Este procedimiento se realizó con los siguientes medios de cultivo, preparados de la siguiente manera (Figura 5):

- Agar de Dextrosa y Papa (PDA): 39 g de agar en 1 L de agua destilada.
- Agar Extracto de Malta (EMA): 33.6 g de agar en 1 L de agua destilada.
- Agar Dextrosa Sabouraud (SDA): 65 g de agar en 1 L de agua destilada.
- Agar Harina de Maíz (HMA): 17 g en 1 L de agua destilada.

El agar de dextrosa y papa, agar extracto de malta y agar dextrosa sabouraud de la compañía DIBICO S.A de C.V y el agar harina de maíz de la compañía Acumedia.

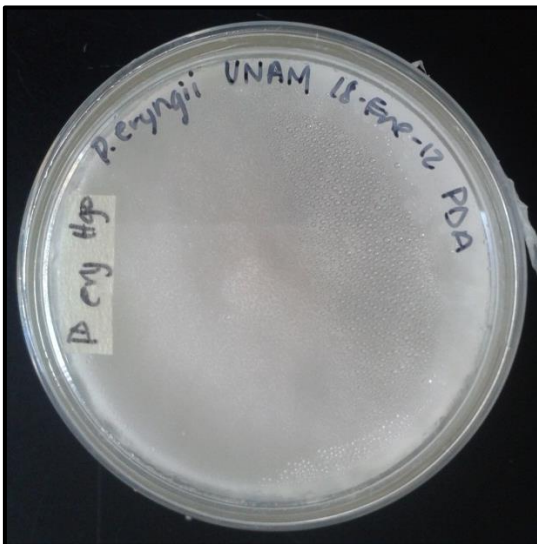


Figura 1: Cepa de *Pleurotus eryngii* utilizada para replicar.



Figura 2: Medio de cultivo preparado.



Figura 3: Área de trabajo.



Figura 4: Cajas Petri inoculadas en incubadora a 25°C.

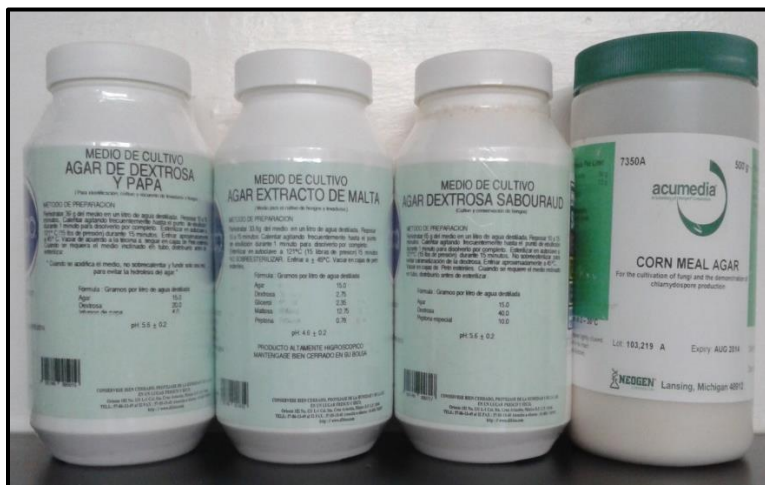


Figura 5: Medios de cultivo utilizados.

2.2. Determinar las condiciones y el medio idóneo para el desarrollo de su crecimiento micelial secundario.

Para esta fase de propagación conocida como producción del blanco o semilla, se utilizó el micelio de la fase 1 y los siguientes granos:

Tabla 1: Granos utilizados para la propagación de micelio secundario.

Nombre Común	Nombre Científico
Alpiste	<i>Phalaris canariensis</i>
Mijo blanco	<i>Panicum miliaceum</i>
Mijo rojo	<i>Panicum miliaceum</i>
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>

Se realizaron dos experimentos con los granos: 24 h de inmersión en agua con cocción y sin cocción y 12 h de inmersión en agua con cocción y sin cocción (Figura 6) con seis réplicas por cada tipo de grano.

Cada uno de los granos se sumergió en agua por 24 h en cubas de plástico con una solución de yeso al 3%. Pasadas las 24 h, la mitad de los granos se hirvieron de 5 a 10 min (cocción) y se extendieron por otras 24 h sobre papel periódico, al igual que el resto de los granos que no fueron cocidos (Figuras 7 y 8). Transcurrido el tiempo de secado, los granos se colocaron en frascos de vidrio previamente lavados, se taparon con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 120°C y 18 lb de presión, los cuales se dejaron reposar. Al día siguiente los frascos junto con el grano se volvieron a esterilizar en autoclave bajo las mismas condiciones y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se vació el grano en cajas Petri desechables de 90x15 mm ya esterilizadas y se procedió a inocular con la cepa de la fase 1, se sellaron con papel "Parafilm", se etiquetaron y se colocaron en incubadora a 25°C (Figuras 9 y 10). Todo esto bajo condiciones totalmente asépticas para evitar contaminación. Durante el periodo de incubación, se midió el crecimiento micelial (mm) cada 3 días. Se trazaron dos ejes transversales sobre la base de la caja, tomando como intersección el

centro del inóculo. Esto mismo se realizó para las pruebas con 12 h de inmersión en agua. De aquí se obtuvo la velocidad de crecimiento. A este proceso se le denomina fase 2 o producción de semilla.



Figura 6: Granos de alpiste, mijo blanco, mijo rojo y trigo en remojo por 12 y 24 horas con yeso al 3%.



Figura 7: Cocción de los distintos granos.



Figura 8: Granos con 12 y 24 h de inmersión en agua extendidos en papel periódico por 24 horas.

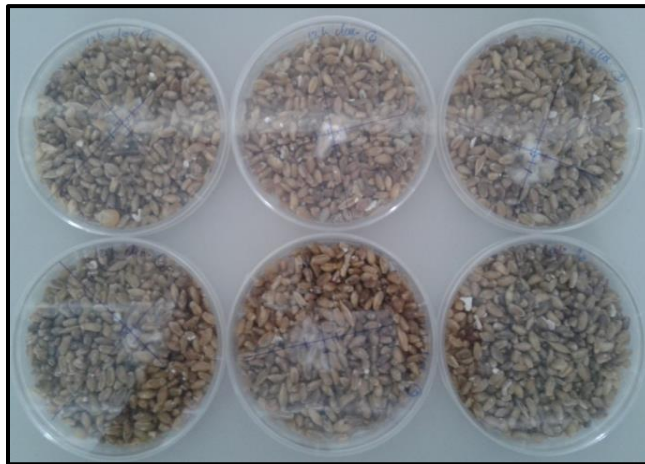


Figura 9: Grano de trigo inoculado.



Figura 10: Cajas Petri en incubadora a 25°C.

2.3. Determinar las condiciones del crecimiento y el substrato idóneo para el desarrollo micelial terciario.

2.3.1. Selección de distintos substratos para el desarrollo del hongo.

Los residuos agroindustriales se obtuvieron de acuerdo a su disponibilidad en la localidad y potencial como substrato para la producción de hongos comestibles en este caso *P. eryngii*.

Tabla 2: Substratos seleccionados para la propagación de micelio terciario.

Nombre común	Nombre científico	Origen	Tratamiento previo
1. Bagazo de algas	<i>Gelidium spp.</i>	Agarmex, S.A de C.V Ensenada B.C.	Se tomó una muestra directa del contenedor del bagazo de algas y se secó con un deshidratador de frutas.
2. Bagazo de tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comercializadora Val-Vita, S.A de C.V Ensenada B.C.	Recepción del tomate, se pasa a la tira de lavado, después por la banda de selección, posteriormente al triturado o molienda, pasa por calentamiento y por último por un filtrado para separar el bagazo de la pulpa. Se tomó la muestra directa del contenedor (aún caliente) y se secó con un deshidratador de frutas.
3. Cascarilla de algodón	<i>Gossypium herbaceum</i>	Carretera Ej. Tabasco-Ej. Paredones, Mexicali B.C.	Se utilizó la cascarilla (sin motita) de la planta de algodón y se trituró en una licuadora.
4. Fibra de coco	<i>Cocos nucifera</i>	Ensenada, B.C.	Se utilizó la fibra de la cáscara de coco de puestos de venta y se trituró en una licuadora.
5. Fibra de yuca	<i>Yucca schidigera</i>	Valle de la Trinidad, Ensenada, B.C.	Exprimido en fresco. Secado al sol por varios meses quedando la fracción gruesa (trozos de fibra y corteza). Después se muele quedando la fracción fina (aserrín).
6. Malta agotada	<i>Hordeum vulgare</i>	Productor de cerveza artesanal, Ensenada B.C.	Se tomó el residuo (granos de cebada) del proceso de la elaboración de cerveza artesanal y se secó con un deshidratador de frutas.
7. Paja de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Carretera Ej. Tabasco-Ej. Paredones, Mexicali B.C.	Se tomó una muestra de la paca y se trituró en licuadora para hacer los pedazos más pequeños.
8. Rastrojo de chícharo	<i>Pisum sativum</i>	Valle de Maneadero, Ensenada B.C.	Residuo de las vainas del chícharo.
9. Vid molida (viruta)	<i>Vitis vinífera</i>	Vinícola Monte Xanic, Valle de Guadalupe.	Triturado en fresco, secado al sol, cribado con malla de albañilería en fracción fina (aserrín y grano chico) y gruesa (astilla y grano grande).

2.3.2. Pasteurización de los substratos.

En frascos de vidrio se dejó remojando el substrato con agua común por 24 h, posteriormente se voltea el frasco y se deja escurrir el substrato por otras 24 h en fase anaerobia.

Transcurrido el tiempo, el substrato se coloca en una bolsa de manta de cielo y se pone en una olla con agua a 80°C por cuatro horas con yeso al 3%. Disminuyendo la temperatura a 25°C, el substrato se pasa a cajas Petri, aproximadamente unos 15 g dependiendo del substrato, y se inocula con la semilla de trigo de la fase 2 con el 5% del peso total del substrato, cuidando todas las condiciones asépticas, sellándolas con papel "Parafilm", etiquetándolas e ingresándolas en incubadora a 25°C (Figuras 11-15). A continuación se presenta una tabla con los substratos utilizados y el número de réplicas y control que se realizaron. Se utilizaron cajas Petri estériles de 90x15 mm de vidrio para el rastrojo de chícharo y para el resto de los substratos fueron cajas desechables (Tabla 3).

Tabla 3: Substratos utilizados y réplicas realizadas.

Substrato	Número de réplicas	Control
Bagazo de algas	11	0
Bagazo de tomate	11	0
Cascarilla de algodón	9	1
Fibra de coco	10	1
Fibra de yuca	10	1
Malta agotada	10	1
Paja de trigo	10	1
Rastrojo de chícharo	8	0
Vid molida	10	1



Figura 11: Fibra de coco y fibra de yuca en remojo por 24 horas.

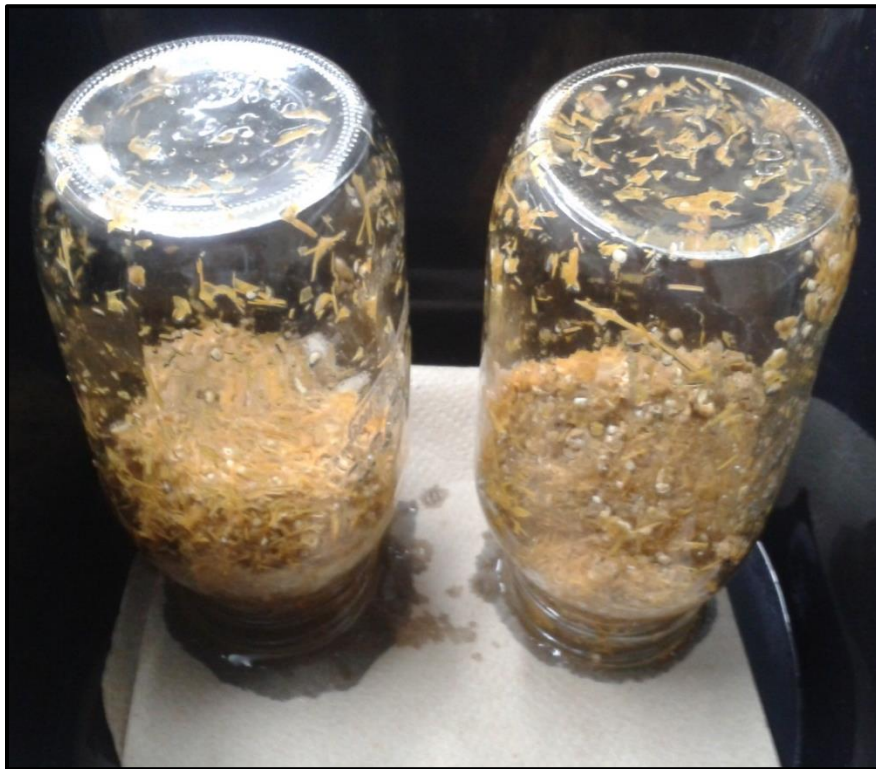


Figura 12: Bagazo de tomate escurriéndose en fase anaerobia por 24 horas.



Figura 13: Substratos en agua con yeso al 3% a 80°C por cuatro horas.

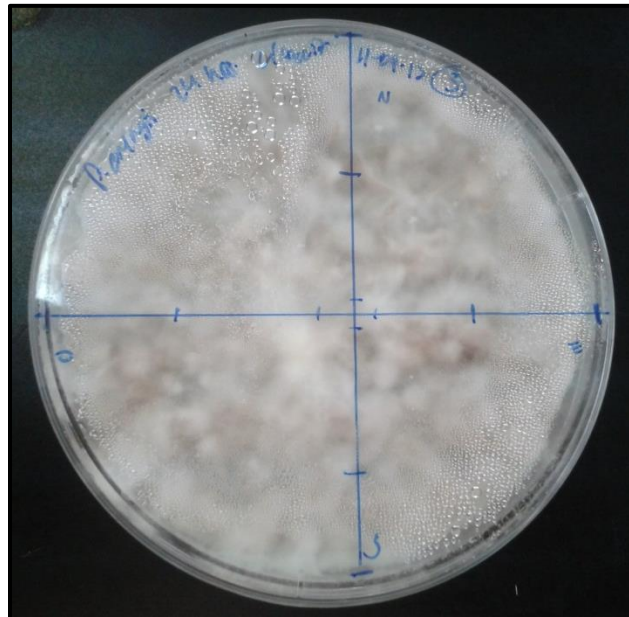


Figura 14: Semilla de trigo lista para ser transferida.



Figura 15: Cajas Petri inoculadas empleando como sustrato madera de vid.

2.4. Técnicas para caracterizar los sustratos más adecuados para la producción de basidiomas de *P. eryngii*.

Las siguientes técnicas se realizaron en la Facultad de Ingeniería Química de la BUAP y en el Laboratorio de Caracterización de Materiales en el Centro Universitario de Vinculación y Tránsito de Tecnología OTC-BUAP.

2.4.1. Espectroscopia infrarroja (FT-IR).

Se utilizó un espectrofotómetro marca BRUKER modelo VERTEX70 con transformada de Fourier (Figura 16). Se realizaron 9 escaneos a un paso de 4 cm^{-1} en la región del IR medio. La finalidad de realizar este análisis es la identificación de los grupos funcionales característicos de la celulosa. Para el análisis se utilizó aproximadamente 1 mg de muestra pulverizada.



Figura 16: Espectrofotómetro

FT-IR.2.4.2. Difracción de rayos X (DRX).

Se utilizó un difractor de rayos X marca BRUKER modelo D8 DISCOVER que opera con una potencia de 40 Kv a un paso de 43.2 segundos a una temperatura de 25°C (Figura 17). Las muestras se analizaron en un intervalo en 2θ de 5°-70°. Se utilizó 1 g de muestra pulverizada para el análisis. El análisis por DRX permitió identificar la naturaleza cristalina o amorfa del substrato.



Figura 17: Difractor de rayos X.

2.4.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610LV con resoluciones de 100X, 250X, 500X, 1000X, 2500X y 5000X y potencia de trabajo de 20 Kv (Figura 18). El análisis por MEB permitió observar con detalle la morfología del sustrato así como detalles superficiales y la composición química elemental de las muestras estudiadas a través del detector de dispersión de energía de rayos X.



Figura 18: Microscopio electrónico de barrido.

2.5. Determinación de los sustratos más adecuados para la producción de basidiomas de *P. eryngii*.

El proceso de producción se llevó a cabo en la empresa “Setas de Baja California S de R.L. de C.V”.

2.5.1. Siembra del hongo.

Dado que la paja de trigo fue de los mejores sustratos donde se desarrolló el micelio y no sufrió de contaminación, se procedió a realizar la formulación a mayor escala en 5 bolsas de plástico de 50x75 cm con 3 kg de sustrato húmedo, inoculadas cada una con 300 gramos de blanco o semilla.

2.5.2. Expansión micelial.

Las bolsas se dejaron incubar por 21 días a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, en oscuridad. Las bolsas se revisaron periódicamente para mantener los parámetros ambientales, revisar si se presentaba alguna contaminación, y la toma de datos.

A través de la determinación de la eficiencia biológica y del rendimiento del substrato elegido para la producción de basidiomas, se pudo determinar la producción de basidiomas por cantidad de substrato utilizado.

2.5.3. Eficiencia biológica.

Se expresa en porcentaje y es obtenida través del peso fresco de los basidiomas, dividido entre el peso seco del substrato y multiplicado por 100 (Chang y Miles, 1989).

2.5.4. Rendimiento.

Expresado en porcentaje, es la determinación de la producción de hongos en relación al substrato húmedo, multiplicado por 100.

2.6. Desarrollar un modelo de simulación para el proceso de producción de *Pleurotus eryngii*.

El modelo de simulación se basa en lo sugerido por Grant (2001) en el que identifica cuatro etapas fundamentales para el desarrollo y uso de un modelo: 1) desarrollo del modelo conceptual, 2) desarrollo del modelo cuantitativo, 3) evaluación del modelo y 4) uso del modelo.

Para representar el proceso de producción de *P. eryngii*, se utilizó como base el modelo conceptual propuesto por Eaton (2014), realizado para representar el cultivo de *P. ostreatus*. Para este estudio se agregaron los resultados obtenidos de *P. eryngii* y se procedió a la simulación en el *software* STELLA, versión 7.0.

La estructura del modelo conceptual, por ser similar el proceso de producción de *P. ostreatus* al de *P. eryngii*, no se modificó sustancialmente, simplemente se utilizaron datos específicos de *P. eryngii* para las etapas 2, 3 y 4 de la modelación según Grant (2001).

El modelo de producción contempla cuatro etapas del proceso de cultivo de hongos comestibles en general: 1) picado y pasteurización del sustrato, 2) siembra, 3) incubación y 4) producción (Tabla 4). En el modelo se incluyó una variable aleatoria para determinar la pérdida de sustrato por manejo inadecuado durante la siembra y por contaminación durante el proceso de incubación. Esta variable se define por la función “random” integrada al programa, que genera una serie de números aleatorios uniformemente distribuidos entre un mínimo y un máximo, así se definió un rango, sobre el cual se calculó el número aleatorio que representa el porcentaje de pérdida por manejo, este rango es definido de acuerdo a los datos experimentales obtenidos en cultivos a baja escala (Ayala, 2014, com.per.). Ejemplo: random (0.02, 0.05), esto genera un número aleatorio entre 0.02 y 0.05 que es considerado como porcentaje de sustrato total sembrado que se contamina por un mal manejo al momento de la siembra (2-5%). Para la contaminación en la etapa de incubación se genera un número aleatorio entre 0.1 y 0.25 que es considerado como porcentaje (10-25%).

Las variables de estado utilizadas para este estudio fueron las mismas que se tomaron como base en el modelo conceptual desarrollado por Eaton (2014), representadas en la tabla 5. Las variables que alimentan el modelo cuantitativo se presentan en la tabla 6 incluidos sus valores y respectivas unidades.

Tabla 44: Etapas del proceso de producción de *Pleurotus eryngii* representadas en el modelo.

	Preparación de sustrato	Incubación	Producción-cosecha
Días	2	3-4-24	25-31
Actividad	<p><u>Picado e hidratación del sustrato:</u> Cortar en segmentos la paja de trigo (PT) de 5-10 cm y remojar el sustrato por 24 horas</p> <p><u>Pasteurización y siembra:</u> Pasteurizar el sustrato por 1 hora de 75 a 80°C, escurrir la PT y colocarla en el área de trabajo, esperar a que baje la temperatura a 25°C. En bolsas de plástico intercalar capas de PT y semilla. Aprox. 500 g de semilla por 5 kg de PT en peso húmedo. Las bolsas cerradas se colocan en incubación a 25°C.</p>	<p>Las bolsas cerradas se colocan en incubación a 25°C ± 5°C por 21 días.</p> <p>Al 3er día hacer perforaciones a las bolsas.</p>	<p>Algunas bolsas son transferidas al área de producción, si no hay humedad ambiental se les puede retirar las bolsas para que la PT quede expuesta, sino es así, realizar perforaciones más grandes donde se presenten primordios</p>

Tabla 5: Lista de indicadores y variables base que alimentan el modelo conceptual.

Indicadores de Estado	Transferencia de Material	Variables Auxiliares
Picado y pasteurización	Kg de sustrato a procesar	Capacidad total en kg Kg perdidos por manejo
Siembra	Kg de sustrato a sembrar g de blanco a utilizar	Capacidad de la bolsa Blanco total
Incubación	Kg sembrados (Bolsas incubadas)	Kg incubados Kg contaminados
Producción	Kg de hongos	Eficiencia biológica Sustrato agotado

Tabla 6: Variables que alimentan el modelo cuantitativo.

Variables	Valores	Unidades
Capacidad total del área de cultivo	0-500	Kg
Cantidad de semilla (blanco) por bolsa de 3-5 kg	0-100	g
Capacidad de la bolsa con substrato húmedo	0-10	Kg
Eficiencia Biológica	0-90	%

2.7. Corroboración de la especie por biología molecular.

Para la extracción de ADN se siguió el método de Martínez y Soto (1993), el cual consistió en el siguiente proceso:

Se colocó en un mortero congelado aproximadamente 30 mg de tejido seco de la especie estudiada. Se añadió nitrógeno líquido, y se molió hasta obtener una mezcla completamente homogénea. Después se transfirieron de 50-100 mg en un microtubo, y se añadieron 400 µL de sol de extracción, el cual se dejó incubar de 30-60 min a 65°C, con mezclado ocasional. Posteriormente se añadieron 400 µL de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico, se mezcló con vortex por 2-3 min, y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos en una micro centrífuga. Una vez terminado el ciclo de centrifugado, se separó la fase acuosa en un microtubo nuevo, se añadieron 300 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión, y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. Finalmente se decantó el sobrenadante, el cual se escurrió sobre papel secante por 5 min, se resuspendió el DNA en 50 µL en agua libre de DNAsas, se dio un ligero vortex, y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

2.7.1. Secuenciación y corroboración por análisis moleculares

A partir del ADN extraído, se amplificaron las regiones genéticas ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3'), ITS1-F (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A3'), ITS2 (5'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC ITS43'), ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'), y LROR (5'ACC CGC TGA ACT TAA GC3').

Para esto se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C, 30 segundos, hibridación (con los cebadores); extensión a 7°C, 1 min; extensión final a 72°C, 7 min.

La secuencia obtenida se comparó con las disponibles en el GenBank, mediante el uso de la herramienta bioinformática BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Esto con la finalidad de corroborar por análisis moleculares, que sea la misma especie con la que se ha estado trabajando.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Crecimiento micelial primario.

La mayor velocidad de crecimiento se registró en agar de dextrosa y papa (PDA), resultando en 16.21 mm y requiriendo de siete días de incubación para cubrir la superficie del medio de cultivo en la caja Petri, esto dio un promedio de 2.32 mm/día, su micelio fue denso, color blanco y fuerte. En agar dextrosa sabouraud (SDA) se registró 17.79 mm de crecimiento, con un desarrollo micelial rápido, de color blanco, semi-denso y promedio de 1.98 mm/día requiriendo de nueve días para su colonización, mientras que en el agar extracto de malta (EMA) se registró un crecimiento micelial de 17.10 mm con un promedio de 1.90 mm/día, observándose un micelio denso, fuerte y de color blanco, al igual que el de PDA, durante nueve días y por último en agar harina de maíz (HMA) el micelio fue débil, tenue, de color semi-transparente apenas perceptible a simple vista con un registro de 15.58 mm, requiriendo de nueve días para cubrir el medio de cultivo y un promedio de 1.73 mm/día (Figuras 19 y 20). El agar de dextrosa y papa presentó un 10% de contaminación, el agar extracto de malta tuvo un 20% de contaminación, y el agar dextrosa sabouraud mostró un 30%, mientras que en el agar harina de maíz no se tuvo contaminantes. Por las características de las colonias y estructuras reproductivas de los contaminantes se determinó que fueron *Aspergillus spp.*, y *Mucor spp.*

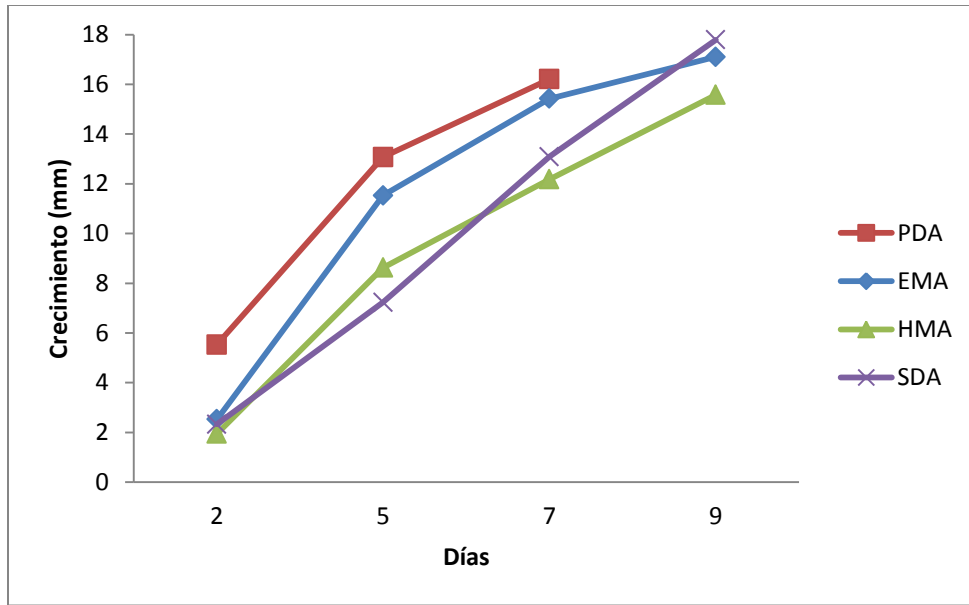


Figura 19: Crecimiento micelial primario en distintos medios de cultivo.

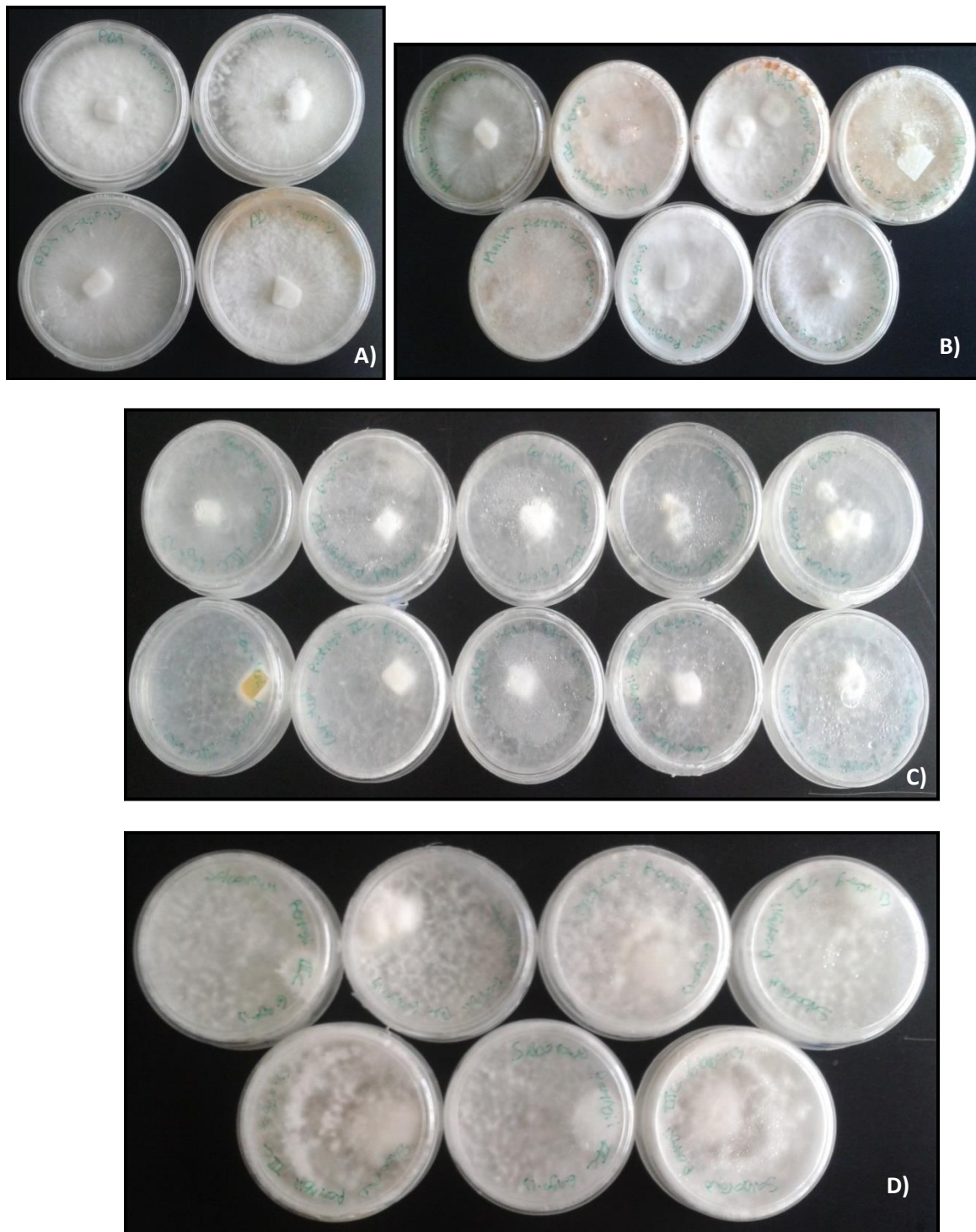


Figura 20: Crecimiento micelial primario en medio de cultivo: A) Agar de Dextrosa y Papa, B) Agar Extracto de Malta, C) Agar Harina de Maíz y D) Agar Dextrosa Sabouraud.

3.2. Crecimiento micelial secundario.

Para el tratamiento de inmersión de grano en agua durante 12 h de remojo, sólo en el grano de trigo se desarrolló el micelio con un crecimiento de 5.17 mm y promedio de 0.86 mm/día con cocción y 2.25 mm con promedio de 0.38 mm/día sin cocción, estos crecimientos se registraron después de seis días (Figura 21).

Para el tratamiento donde los granos fueron sumergidos en agua durante 24 h con cocción, el grano de trigo registró un crecimiento de 38.75 mm, requiriendo de seis días para completar la caja con un promedio de 6.46 mm/día, seguido por el grano de alpiste con un crecimiento de 40.08 mm, cubriendo la caja Petri en ocho días y un promedio de 5.01 mm/día. Los granos de mijo blanco y mijo rojo con cocción tuvieron un crecimiento micelial de 24.79 y 15.79 mm y promedios de 3.10 y 1.97 mm/día respectivamente (Figura 22). En el tratamiento donde los granos no fueron sometidos a cocción presentaron valores por debajo de los 10 mm con promedios debajo de 1.21 mm/día excepto el grano de trigo que registró 36.49 mm de crecimiento y un promedio de 4.56 mm/día (Figura 23).

Durante ambos tratamientos no se presentó contaminación.



Figura 21: Crecimiento micelial secundario en granos de trigo con el tratamiento de 12 h de remojo. c/c: con cocción; s/c: sin cocción.

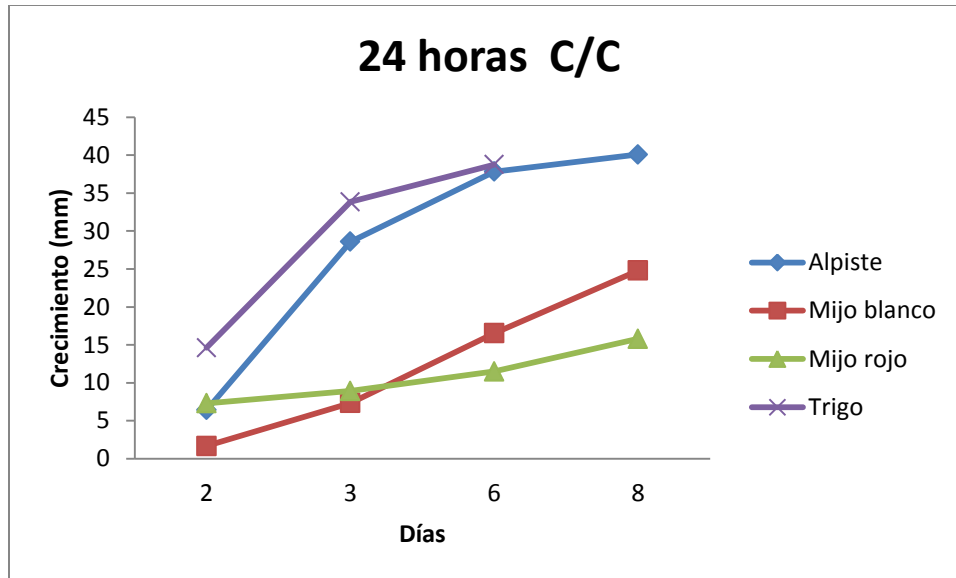


Figura 22: Crecimiento micelial secundario en distintos granos con el tratamiento de 24 h de remojo. C/C: con cocción.

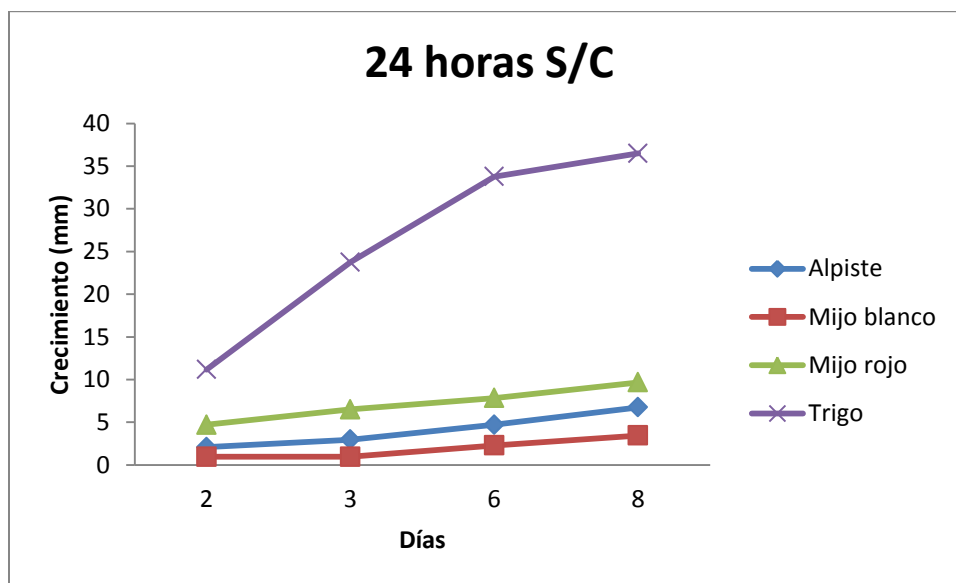


Figura 23: Crecimiento micelial secundario en distintos granos con el tratamiento de 24 h de remojo. S/C: sin cocción.

Las Figuras 24, 25, 26 y 27, muestran el desarrollo del micelio (de mayor a menor) en los cuatro tipos de granos para el tratamiento de 24 horas de inmersión en agua con cocción y sin cocción.

En los granos de trigo se observó un micelio fuerte, denso de color blanco y de rápido crecimiento. El grano de alpiste fue el que mostró un mayor crecimiento micelial. En el

caso del mijo blanco el micelio fue más débil y menos denso, de color blanco semi transparente y en el mijo rojo no se tuvo desarrollo micelial significativo.

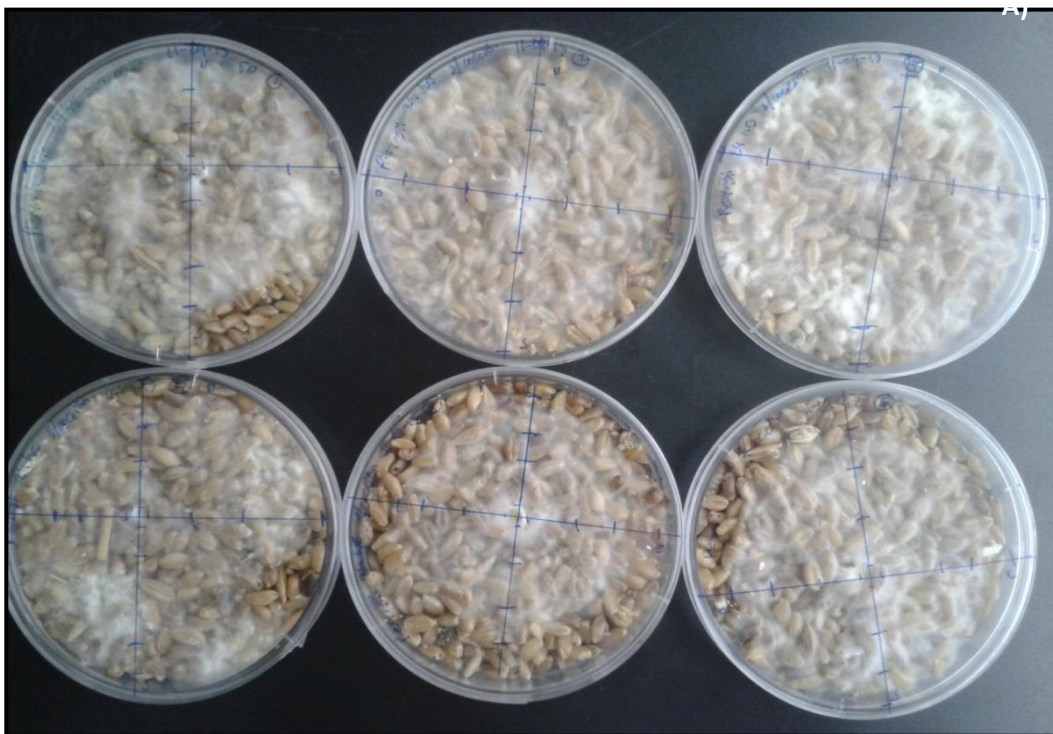
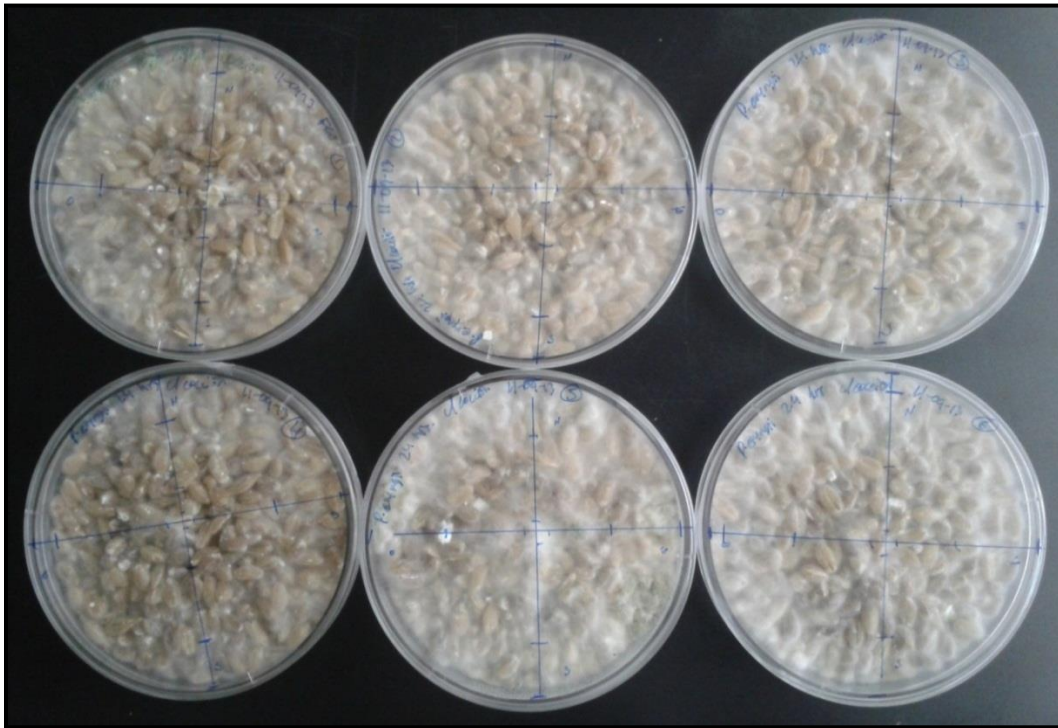


Figura 24: Grano de Trigo: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.

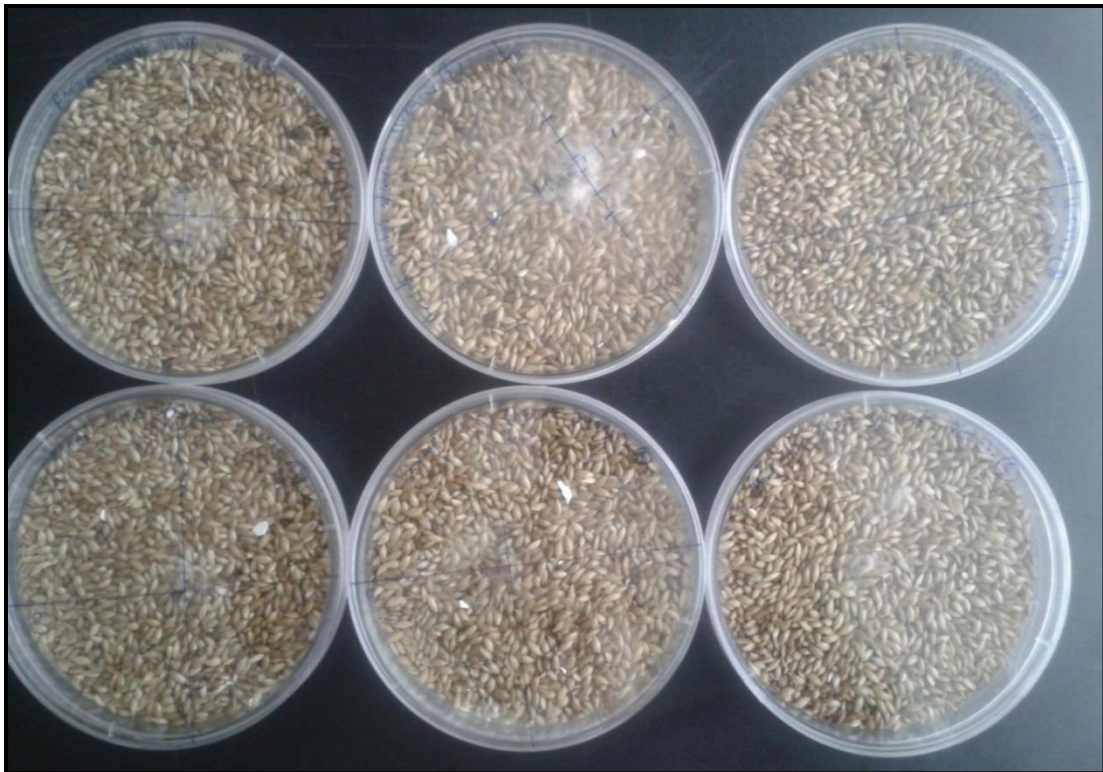
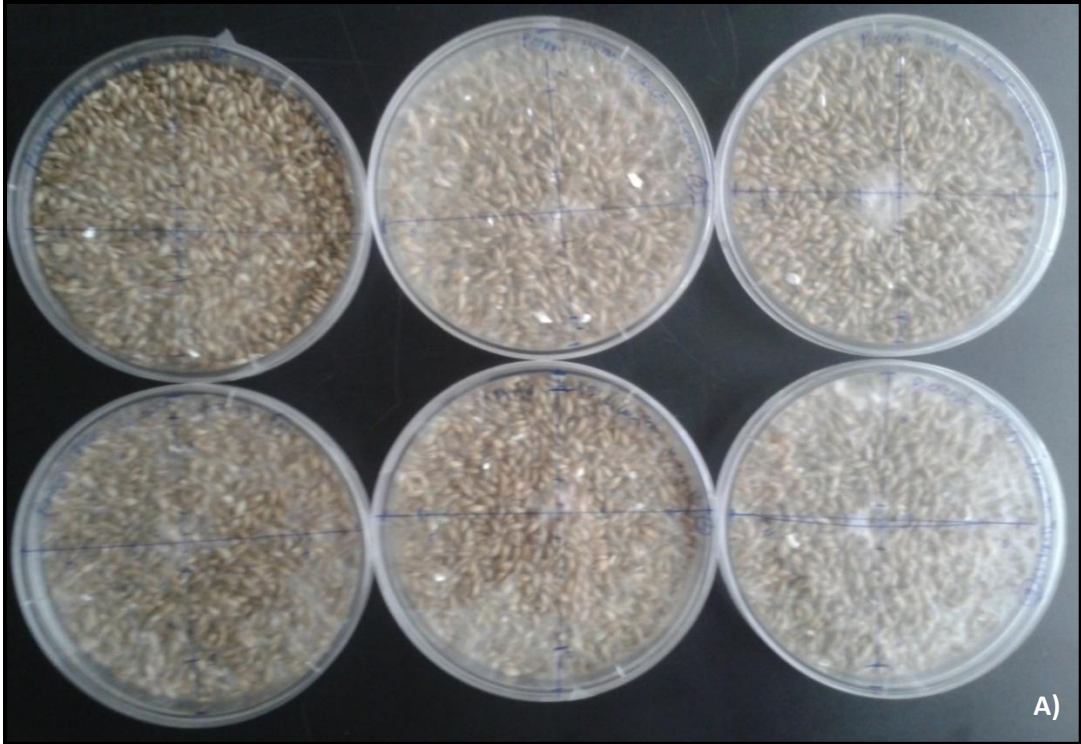
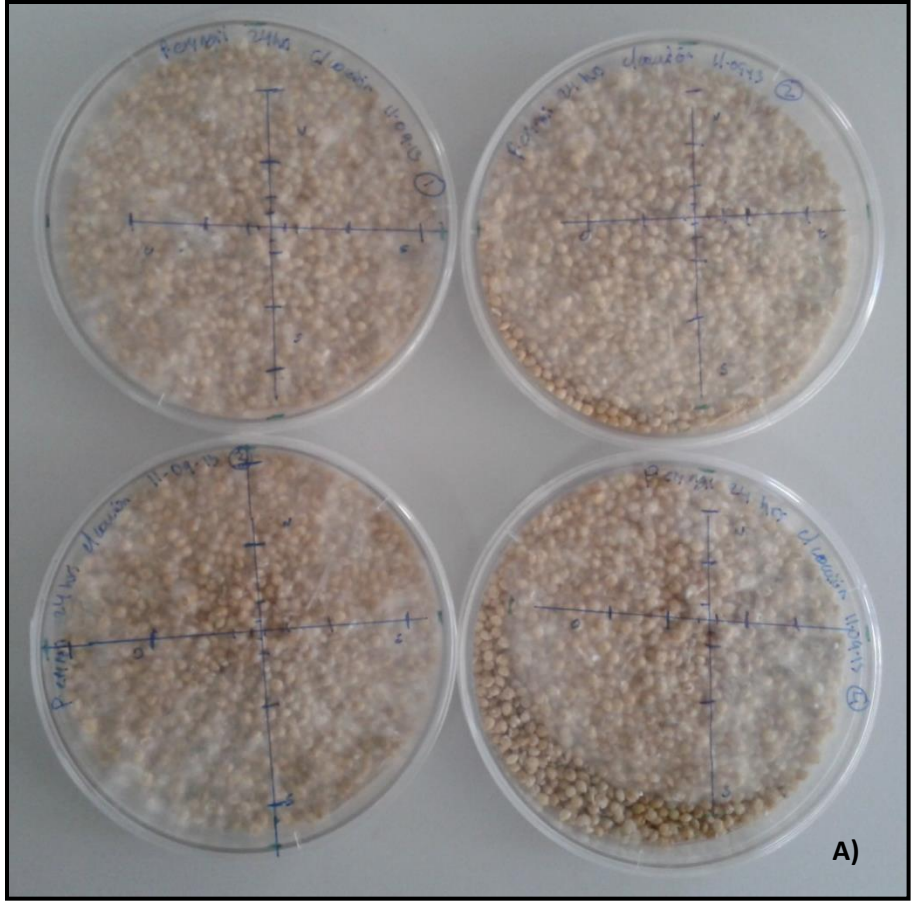


Figura 25: Grano de Alpiste: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.



A)

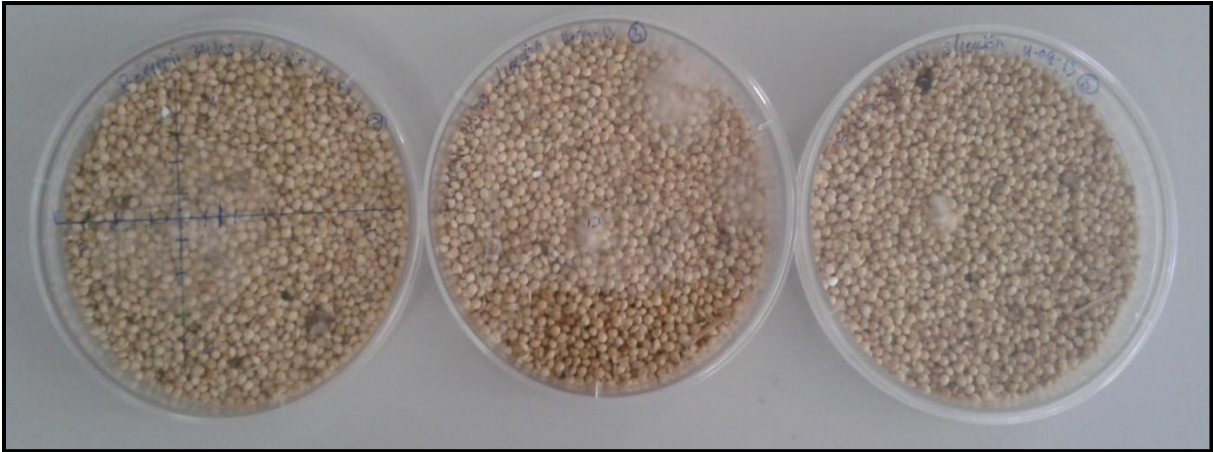


Figura 26: Grano de Mijo blanco: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.

B)

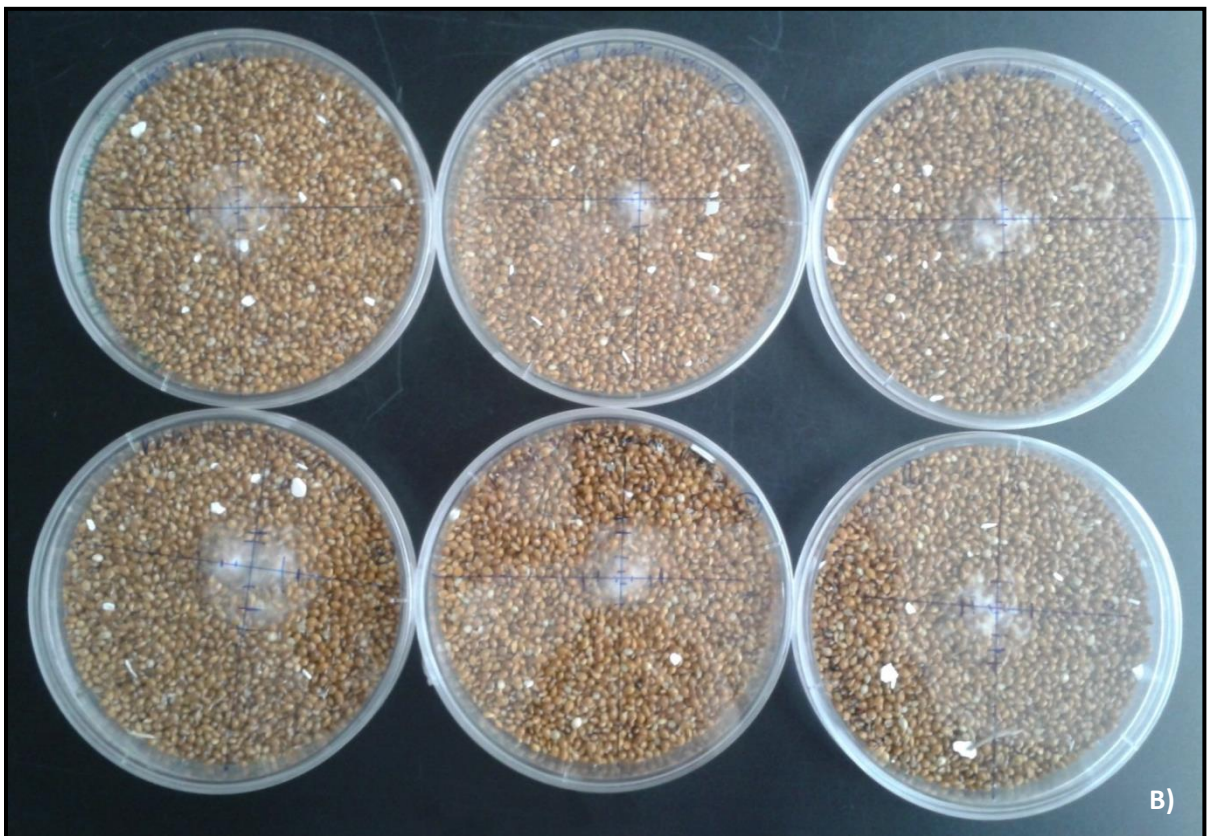
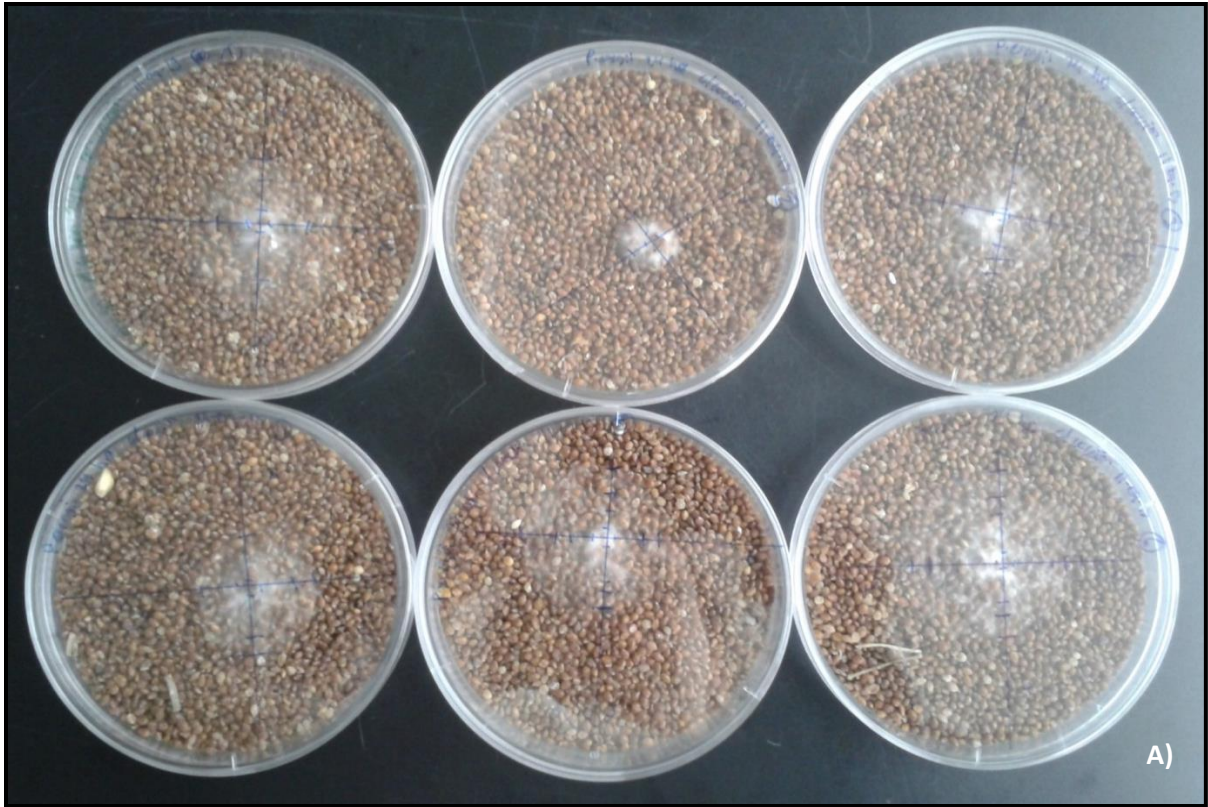


Figura 27: Grano de Mijo rojo: A) 24 h con cocción; B) 24 h sin cocción.

3.3. Crecimiento micelial terciario.

En el substrato de rastrojo de chícharo (RC) el micelio de *P. eryngii* tardó ocho días en su colonización total, seguidos por el bagazo de algas (BA) y el bagazo de tomate (BT) en los que el micelio requirió de once días, mientras que necesito de catorce días para colonizar los substratos de fibra de coco (FC), fibra de yuca (FY) y paja de trigo (PT) y vid molida (VM), de dieciséis días para colonizar la cascarilla de algodón. En el substrato de malta agotada, residuo de la elaboración de cerveza (MA), el desarrollo del micelial fue nulo (Figura 28).

La malta agotada presentó una contaminación del 100%, mientras que el bagazo de algas y el bagazo de tomate tuvieron un 80% de contaminación. El resto de los substratos no presento contaminación. Al igual que en la fase de crecimiento micelial primario los contaminantes encontrados fueron *Aspergillus spp.*, y *Mucor spp* (Figura 41).

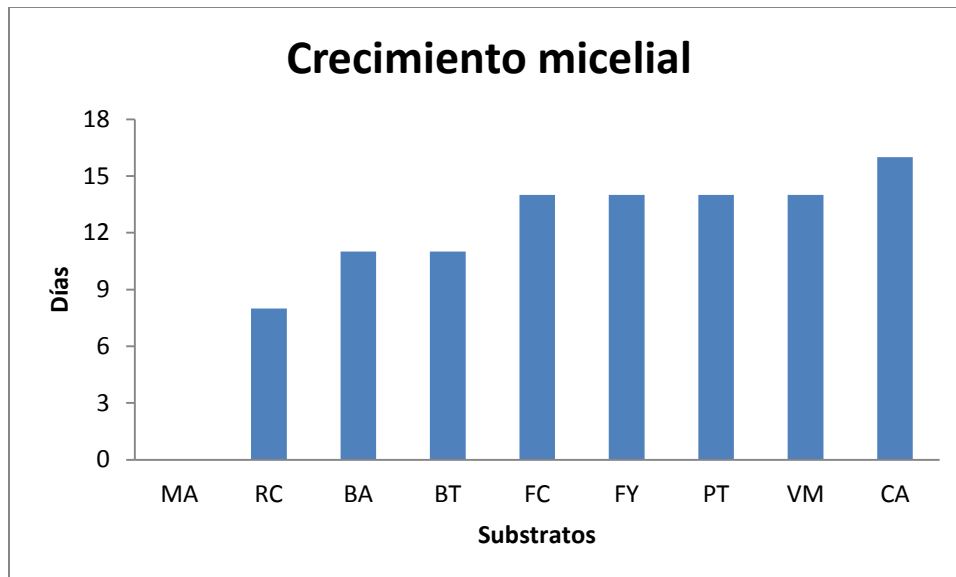


Figura 28: Crecimiento micelial terciario en distintos substratos: MA: malta agotada; RC: rastrojo de chícharo; BA: bagazo de algas; BT: bagazo de tomate; FC: fibra de coco; FY: fibra de yuca; PT: paja de trigo; VM: vid molida y CA: cascarilla de algodón.

El micelio fue de color blanco, denso, fuerte y algodonoso en los sustratos de: rastrojo de chícharo, bagazo de tomate, fibra de coco, fibra de yuca, paja de trigo y cascarilla de algodón (ver Figuras 29, 30, 31, 32, 33 y 34). En el bagazo de algas el micelio se desarrolló débilmente (Figura 35). En vid molida presentó un crecimiento micelial en sólo dos réplicas, el micelio no fue tan denso como en los anteriores sustratos pero si tuvo un crecimiento ramificado (ver Figura 36). Finalmente en la malta agotada no se presentó algún crecimiento y los primeros primordios se presentaron a los 35 días de ser inoculados en los sustratos de fibra de coco y fibra de yuca (ver Figuras 37-40).

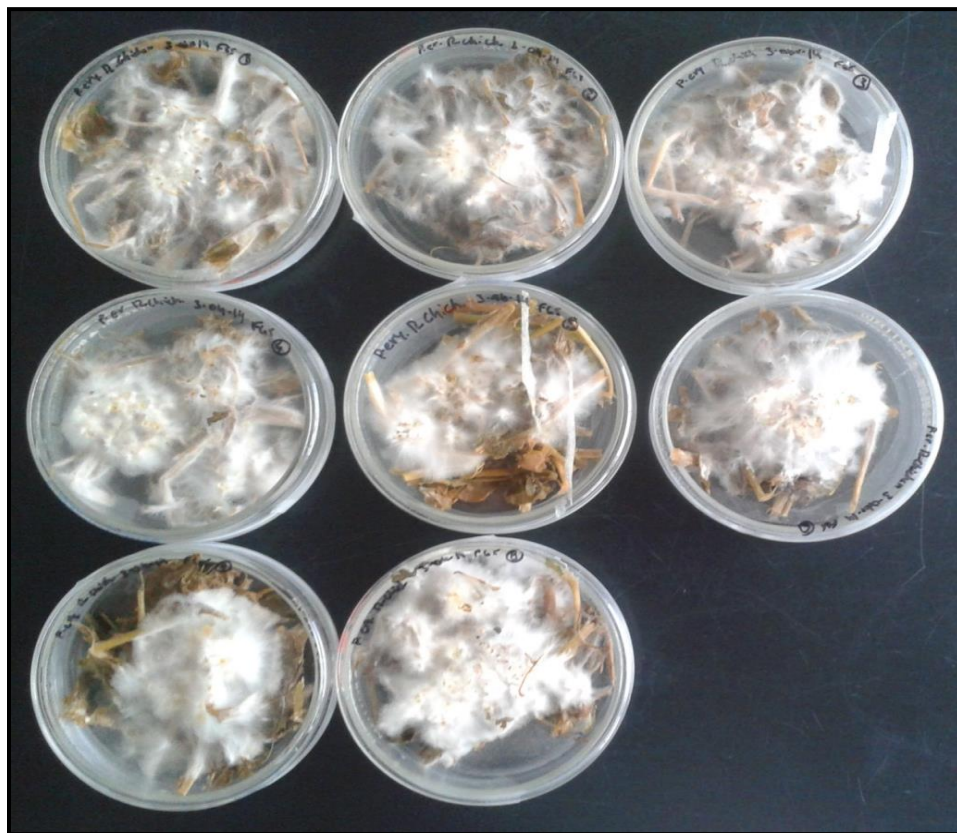


Figura 29: Crecimiento micelial terciario en rastrojo de chícharo.

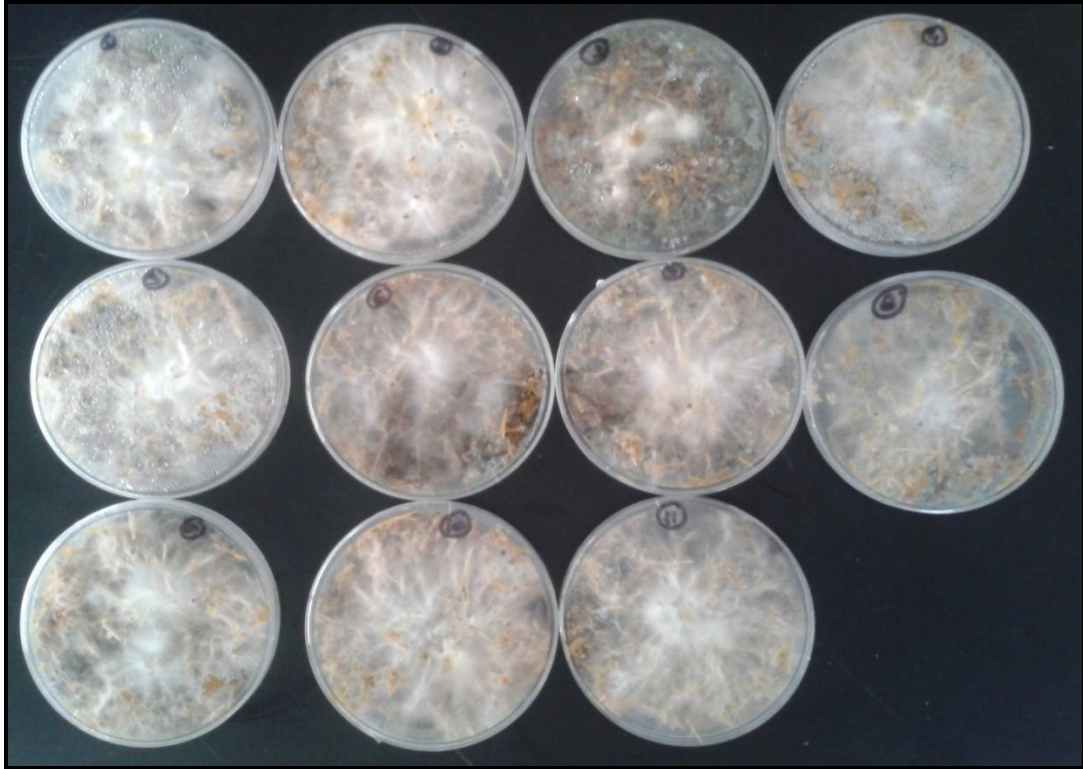


Figura 30: Crecimiento micelial terciario en bagazo de tomate.

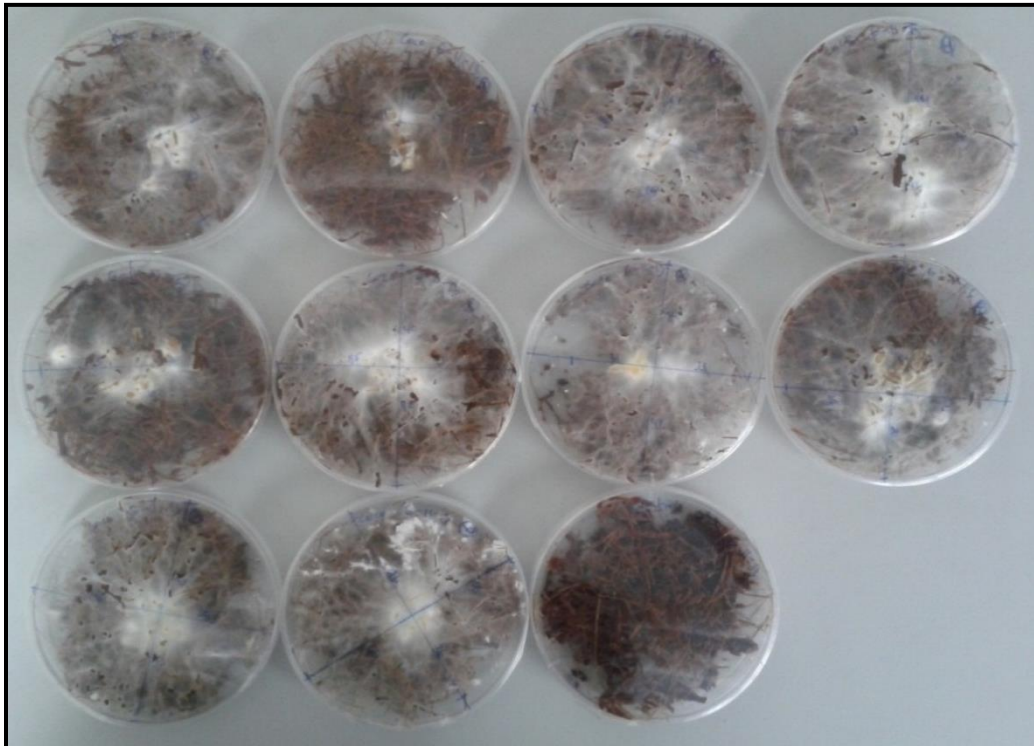


Figura 31: Crecimiento micelial terciario en fibra coco.

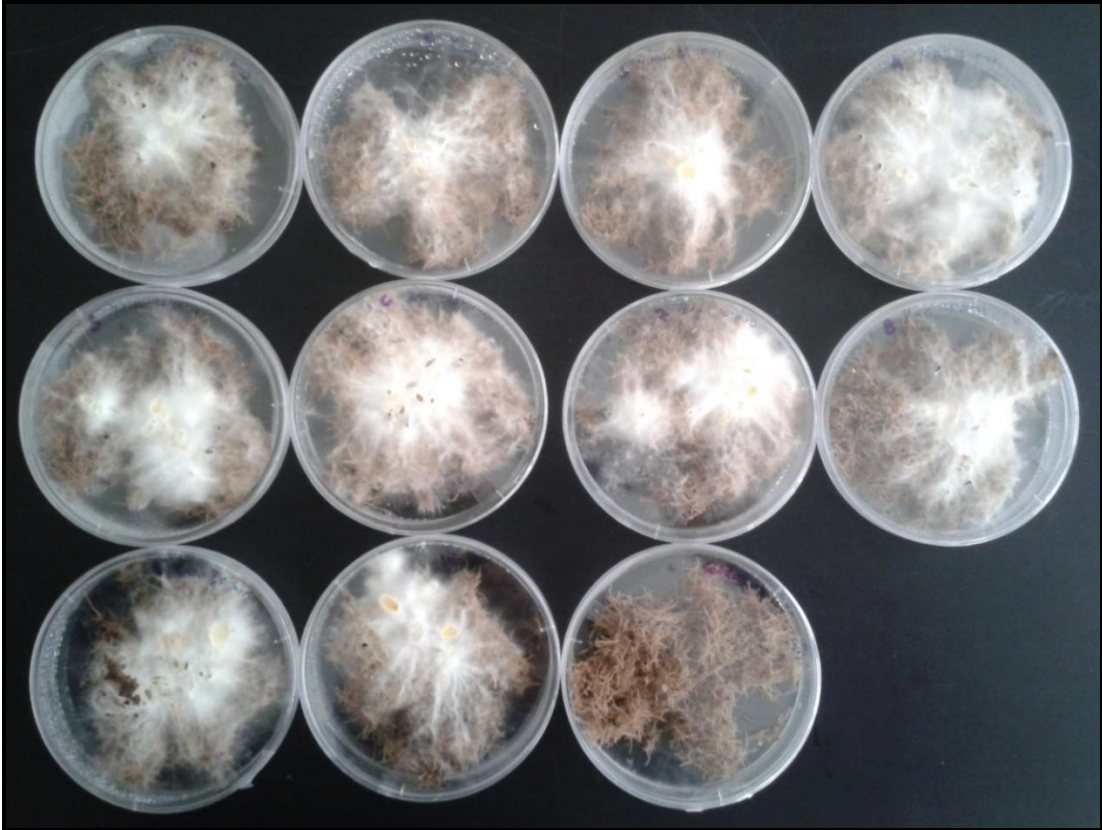


Figura 32: Crecimiento micelial terciario en fibra de yuca.

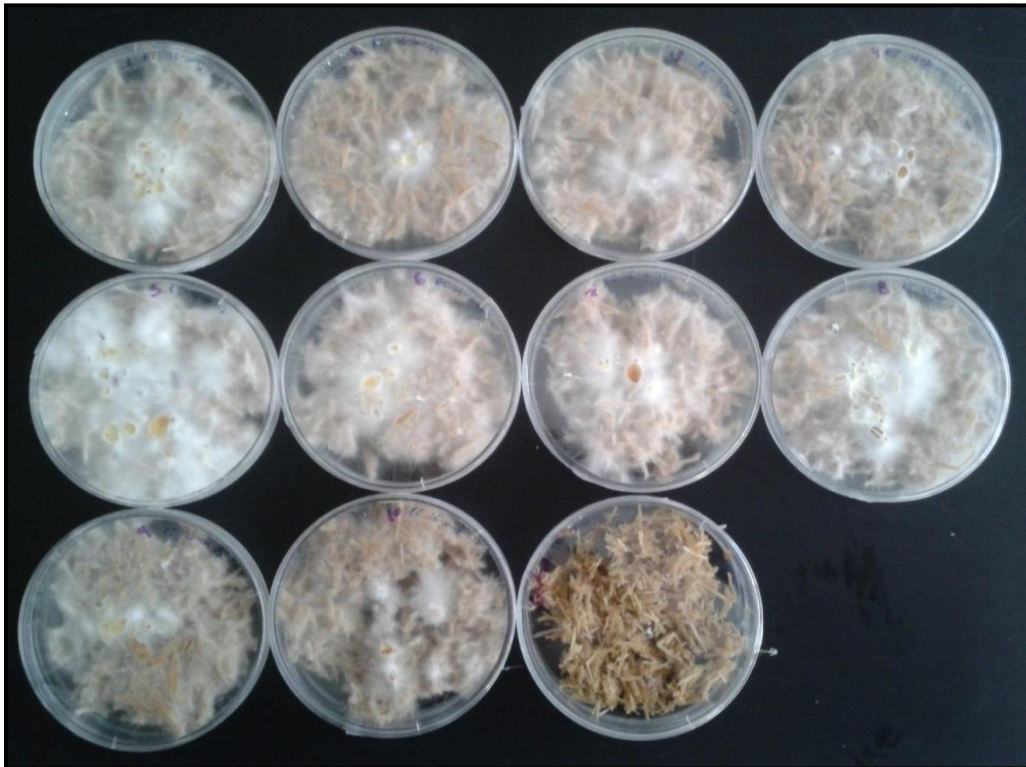


Figura 33: Crecimiento micelial terciario en paja de trigo.

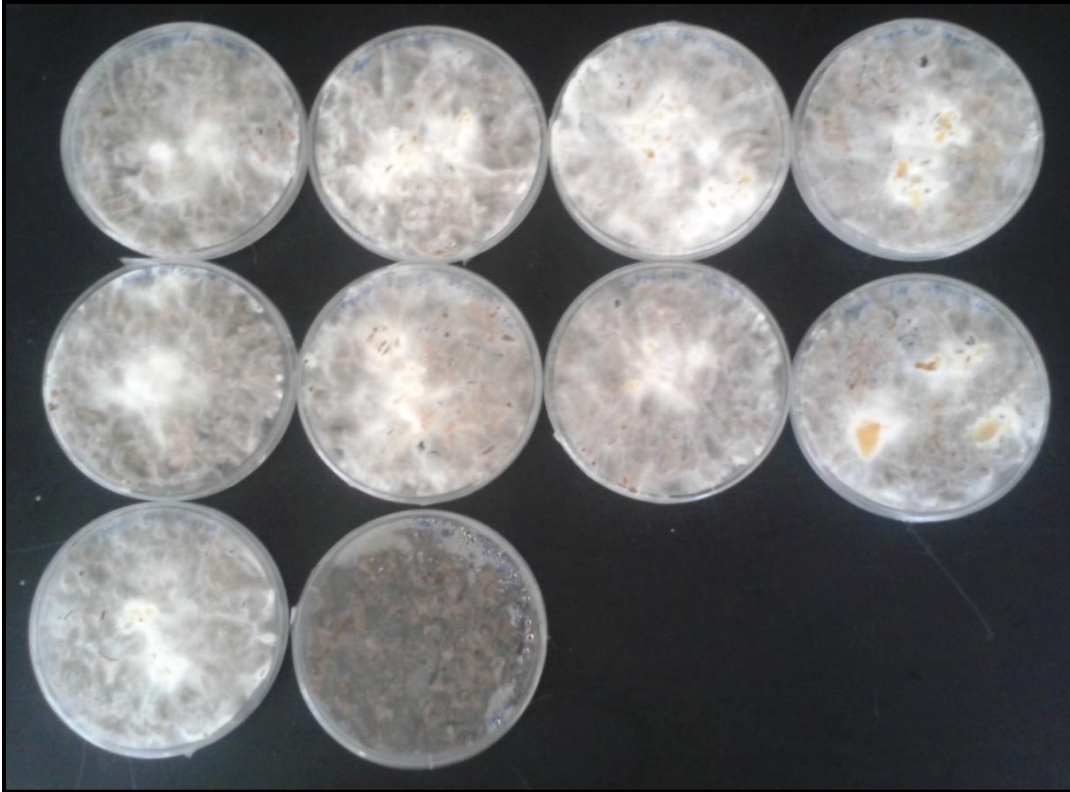


Figura 34: Crecimiento micelial terciario en cascarilla de algodón.

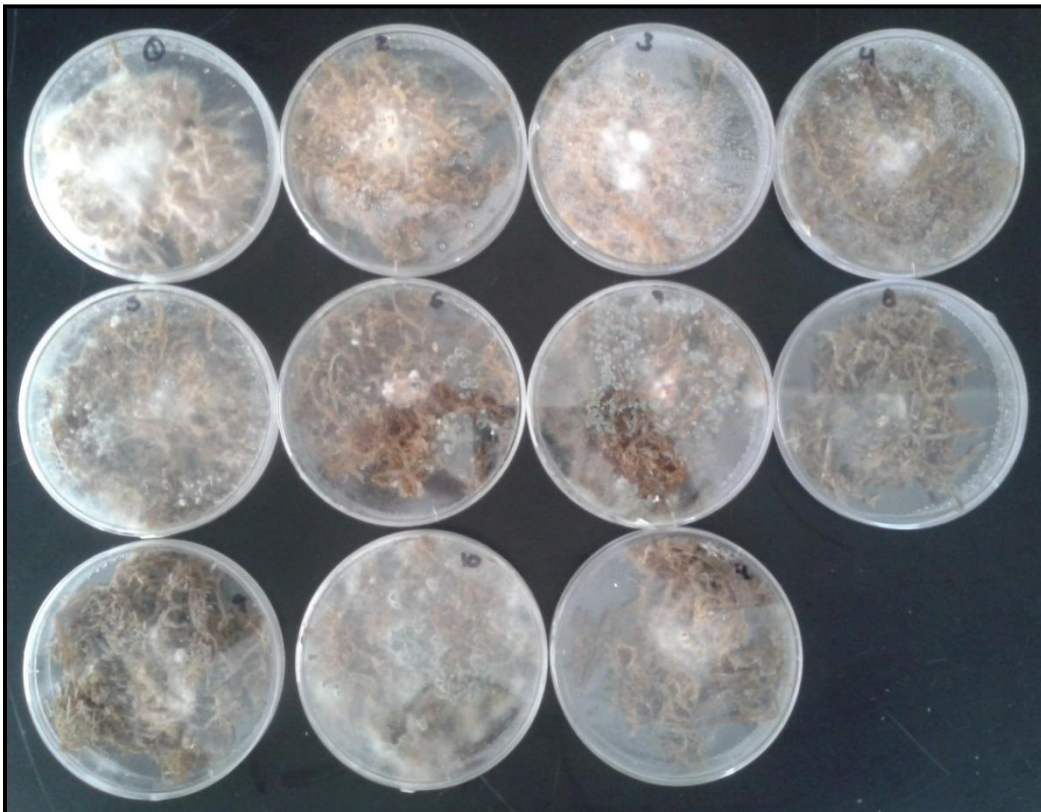


Figura 35: Crecimiento micelial terciario en bagazo de algas.

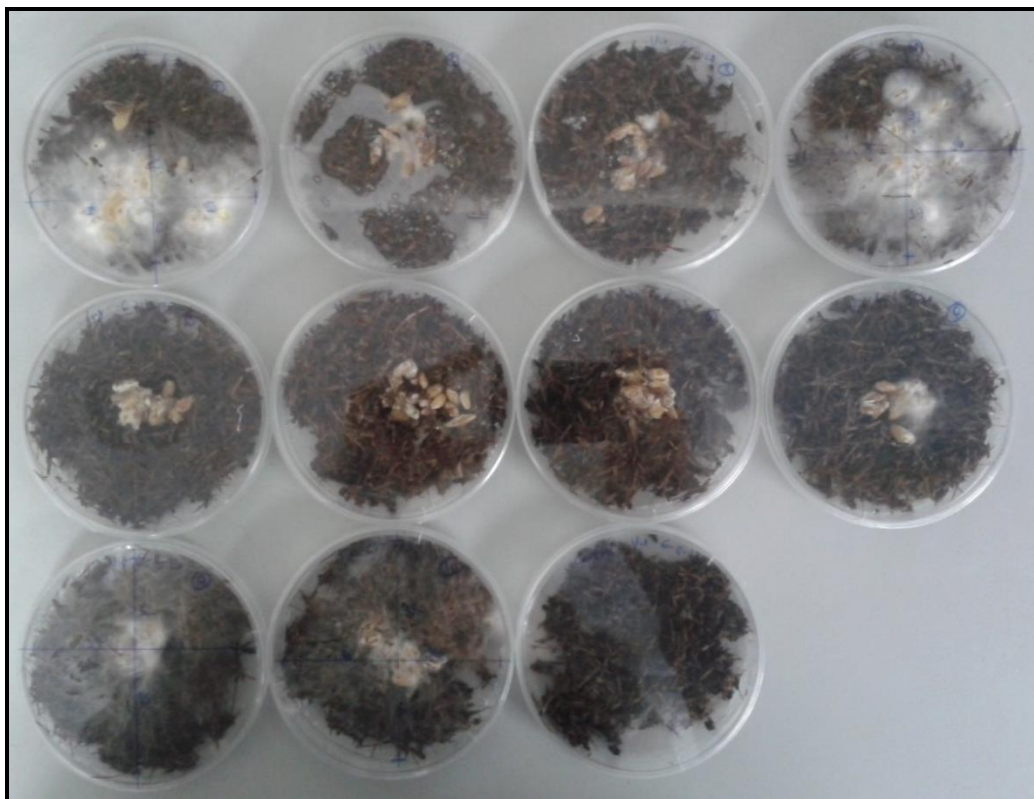


Figura 36: Crecimiento micelial terciario en vid molida.

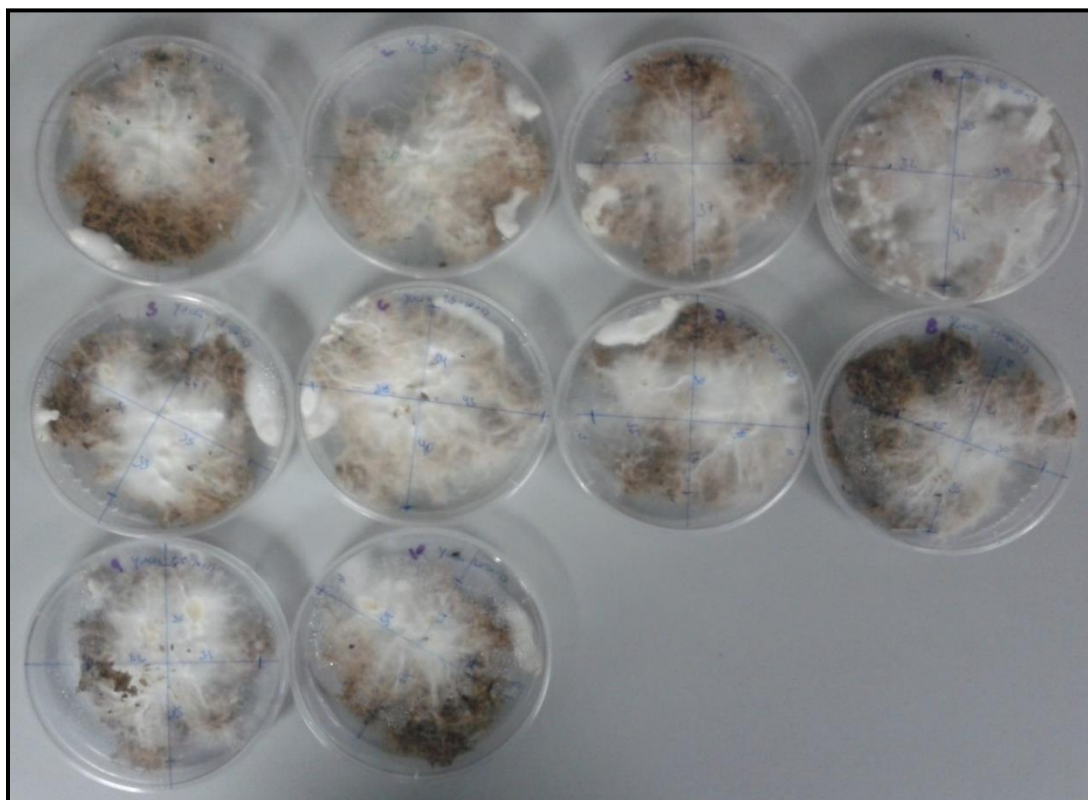


Figura 37: Fibra de yuca con algunos primordios a los 35 días de ser inoculado.

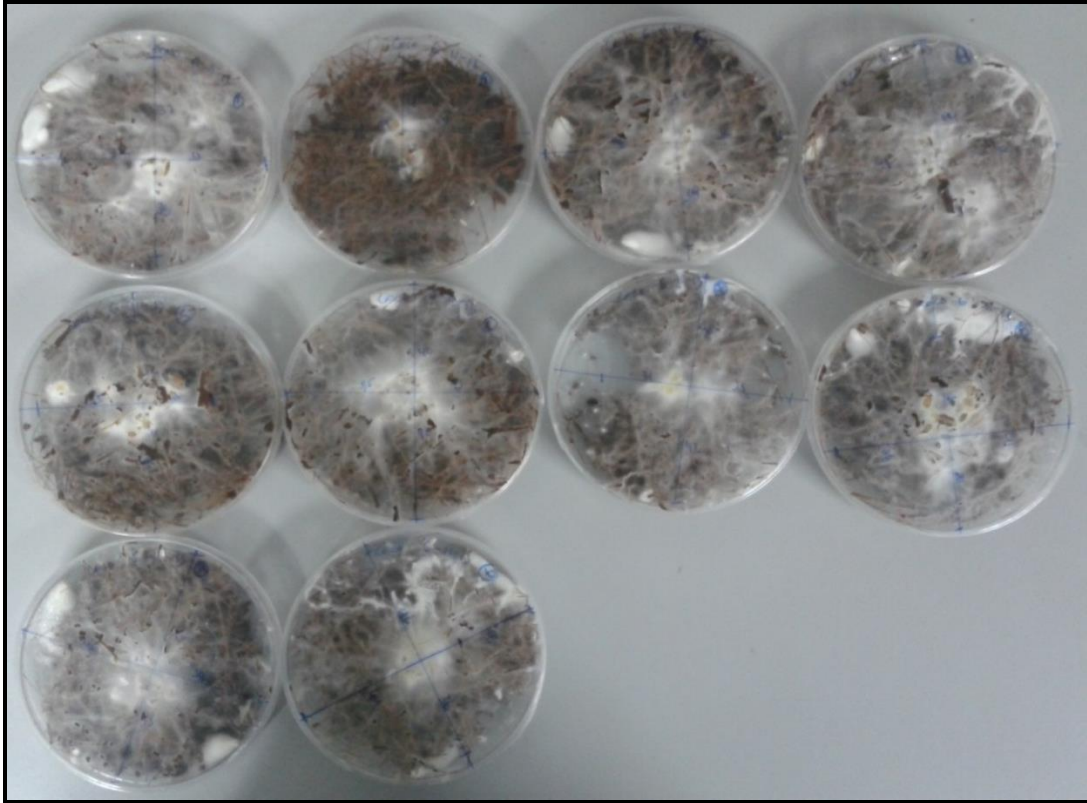


Figura 38: Fibra de coco con algunos primordios a los 35 días de ser inoculado.



Figura 39: Fibra de coco con primordio.



Figura 40: Fibra de yuca con primordios.



Figura 41: Bagazo de algas contaminado con *Aspergillus* spp.

3.4. Caracterización física de sustratos.

3.4.1. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR).

En la Figura 42 se muestran los espectros de cinco muestras estudiadas, que fueron las mejores según el tiempo, desarrollo y crecimiento micelial que se obtuvo: cascarilla de algodón (CA), fibra de coco (FC), fibra de yuca (FY), paja de trigo (PT) y rastrojo de chícharo (RC). La banda característica de los grupo O-H se observa en la región de los 3300 cm^{-1} característico de la celulosa y la hemicelulosa (Espitia, 2010), presentes en todas las muestras. Las bandas que aparecen a 2918 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} para el RC, 2919 cm^{-1} y en la PT son asignadas a las vibraciones del enlace C-H. La banda presente en 1736 cm^{-1} de la CA corresponde al enlace C=O. En la muestra de PT se encuentra un pico en la banda 1637 cm^{-1} del enlace C=C, muy cerca se encuentra la banda 1628 cm^{-1} del enlace C=N de RC. La región 1600 cm^{-1} muestra al enlace N-H presentes en la FY, la FC y la CA. La banda 1316 cm^{-1} del enlace S=O en la muestra de FY, finalmente la máxima absorbancia se observó en un pico ancho en la región aproximada de 1000 cm^{-1} del grupo C-X.

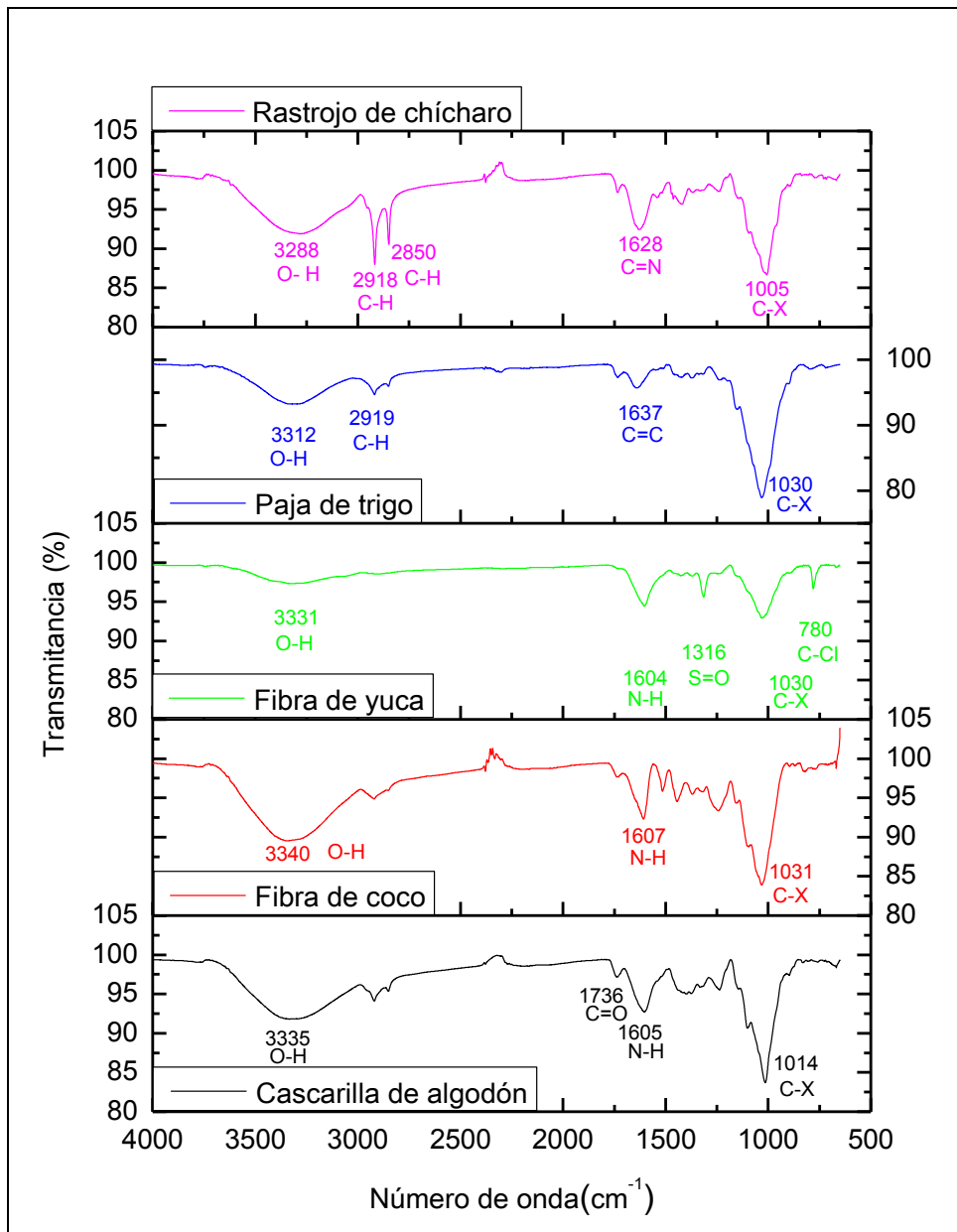


Figura 42: Espectros infrarrojos de los substratos utilizados: cascarilla de algodón, fibra de coco, fibra de yuca, paja de trigo y rastrojo de chícharo.

3.4.2. Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 43 se muestran los difractogramas de cinco muestras estudiadas: cascarilla de algodón (CA), fibra de coco (FC), fibra de yuca (FY), paja de trigo (PT) y rastrojo de chícharo (RC). La CA presenta reflexiones en 14.3, 16.8, y 21.7° característicos de la celulosa alfa de acuerdo con la ficha pdf 00-056-1719; la estructura correspondiente es triclinica. La FC presenta señales en 14.0, 16.9 y 21.8°

característicos de la celulosa alfa de acuerdo con la ficha pdf 00-056-1719 con estructura triclinica. En la FY se hallan reflexiones en 15, 21.9, 23° esta última característica de celulosa beta con estructura cristalina monoclinica. Señales como 24.4, 30.2, 36, 38, 40 y 49° aparecen en la yuca, representativas del almidón con estructura cristalina monoclinica; la yuca, además de celulosa, contiene almidón con alto grado de cristalinidad indicado por las señales bien definidas en los ángulos mencionados. En el caso de la PT presenta señales en 16.5 y 22.2. 28.4, 31.8 y 40.7°, los primeros ángulos característicos de la celulosa de acuerdo con la ficha pdf 00-050-2241. Finalmente el RC muestra señales en 21.6, 26.8, 28.5, y 40.7°, las primeras características de la celulosa de acuerdo a la ficha pdf 00-050-2241.

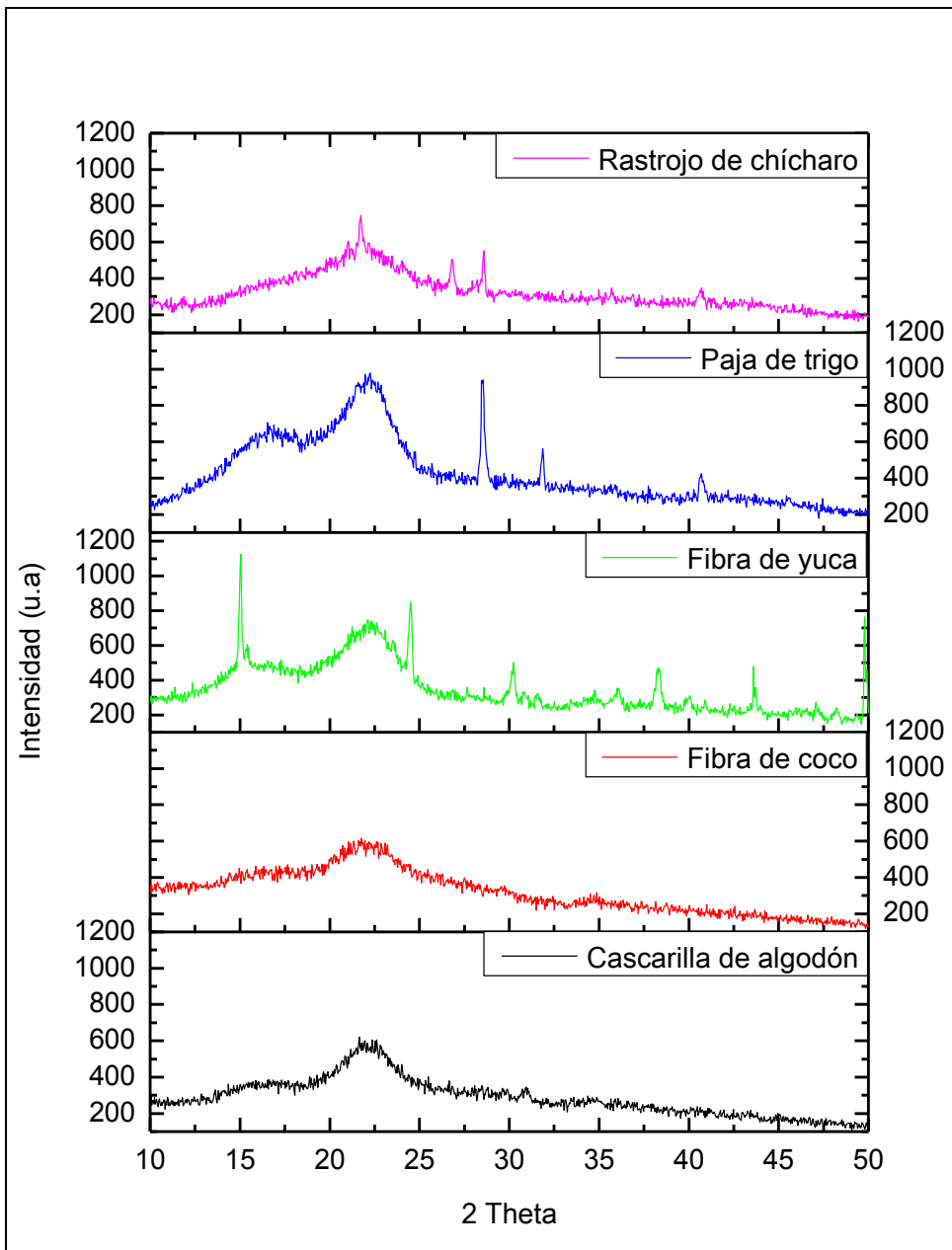


Figura 43: Difractograma de los sustratos utilizados: cascarilla de algodón, fibra de coco, fibra de yuca, paja de trigo y rastrojo de chícharo.

3.4.3. Microscopia Electrónica de Barrido

Las imágenes de la fibra de coco, fibra de yuca y cascarilla de algodón a aumentos de 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x, permitieron observar a detalle la morfología del material y detalles superficiales presentes en las muestras. El estudio de la morfología y estructura de la fibra de coco permitieron observar la porosidad del sustrato (Figura

44). En el caso de la fibra de yuca está compuesta a su vez por pequeñas fibrillas, presentando también algunos cristales marcados en círculo rojo así como su porosidad (Figura 45). En la cascarilla de algodón se presenta una superficie rugosa y la formación de unos hilillos y conforme se incrementa el aumento se aprecian las fibrillas de manera paralela y algunas entretejidas (Figura 46).

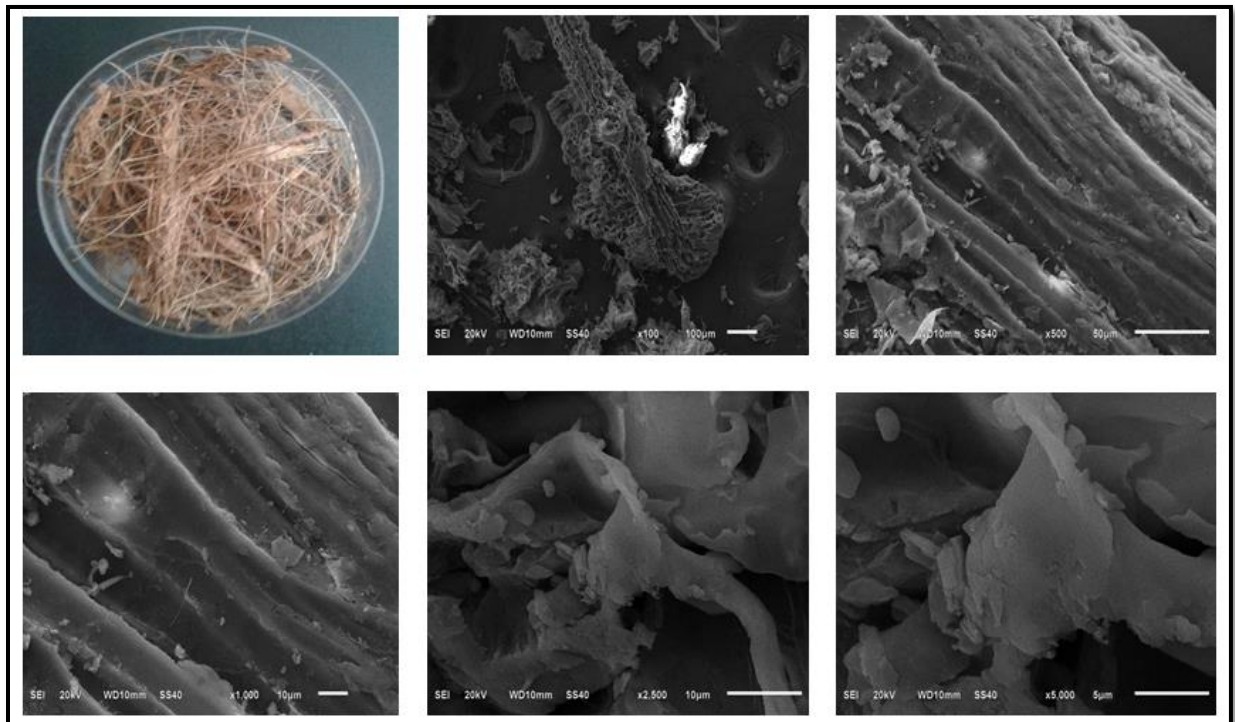


Figura 44: Fibra de coco vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x.

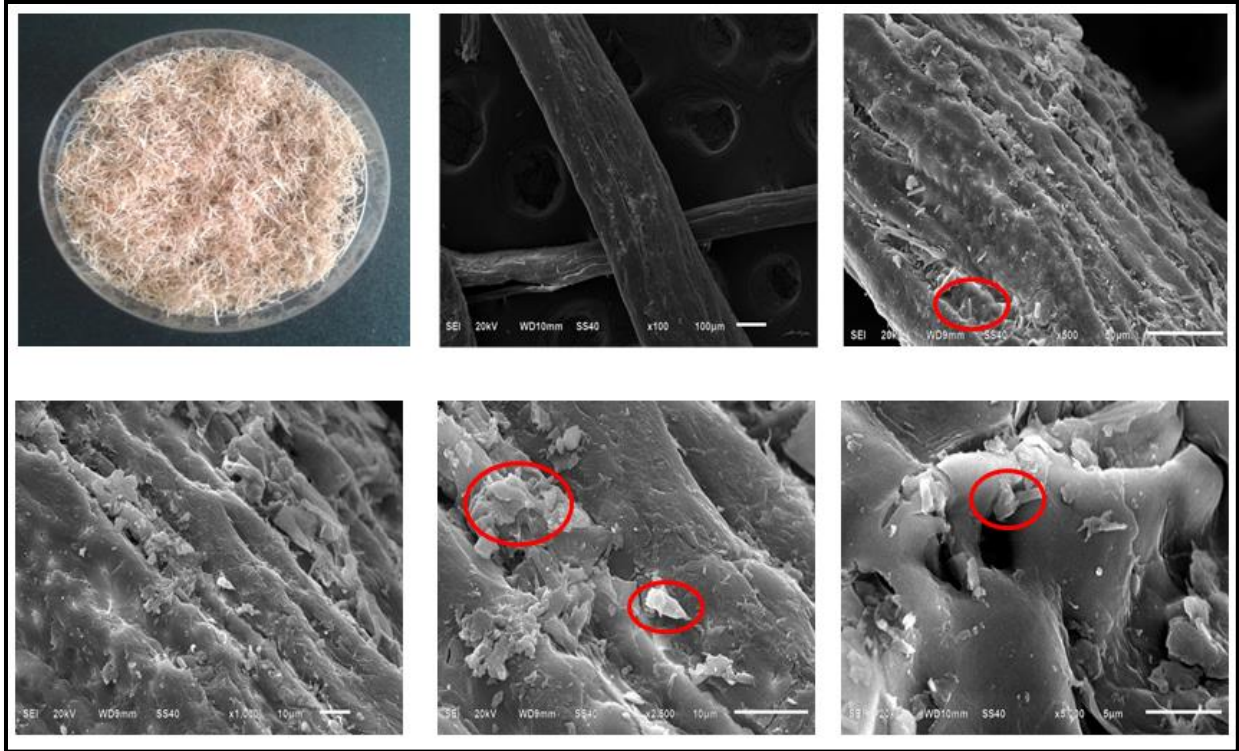


Figura 45: Fibra de yuca vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x, presentando cristales marcados con círculos rojos.

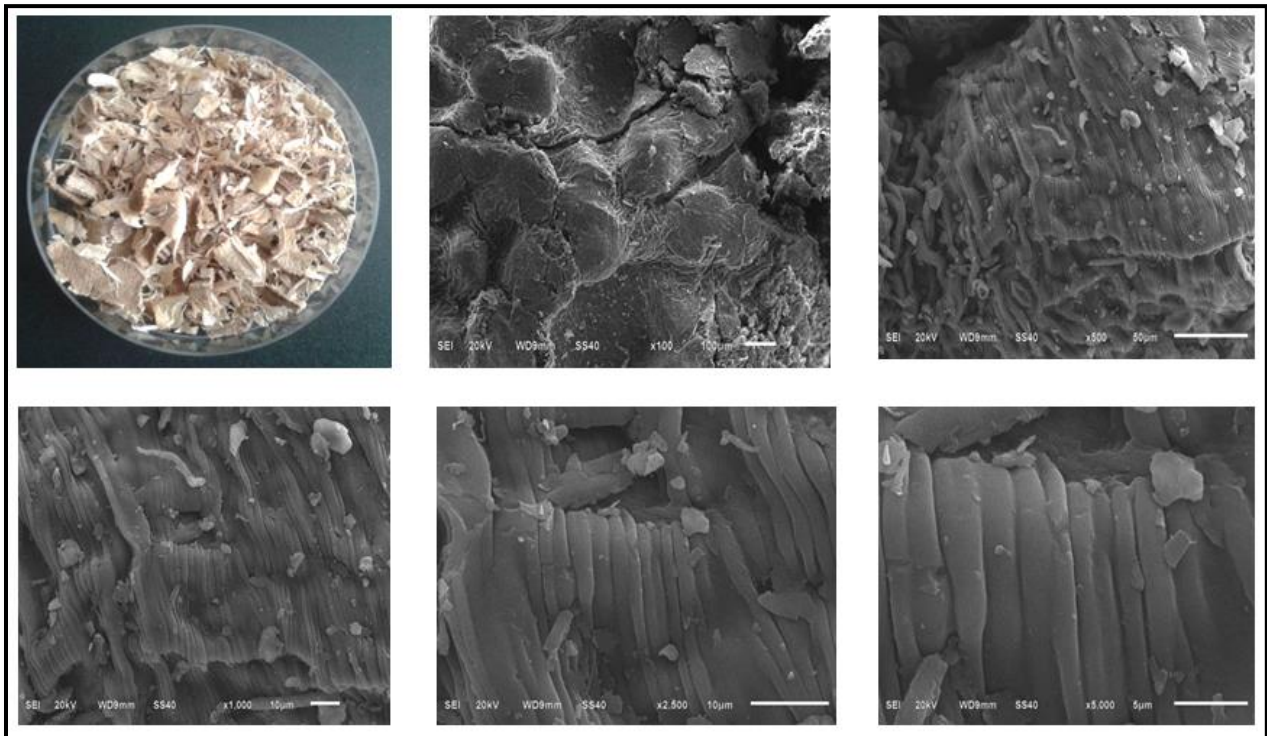


Figura 46: Cascarrilla de algodón vista a 100x, 500x, 1000x, 2500x y 5000x.

3.5. Determinación de los sustratos más adecuados para la producción de basidiomas de *P. eryngii*.

3.5.1. Eficiencia biológica y rendimiento.

Tras la siembra de *P. eryngii* en paja de trigo se logró una eficiencia biológica del 65.56%. La producción fue de 3 cosechas. Se necesitaron entre 21 y 28 días para la producción total y se obtuvo un rendimiento de 39.33%.

Se registró una media del diámetro del píleo de 7.18 cm, del diámetro del estípite 2.79 cm y una longitud de 9.34 cm.

En la Figura 47, se observan los primeros cuerpos fructíferos a los 25 días. Todos los basidiomas presentaron un color pardo claro (café muy pálido), píleo con epicutis fácilmente desprendible, láminas y estípite de color blanco. Himenio con láminas decurrentes, apretadas y lamelulas. Estípite largo ligeramente curvado y ensanchado en la base (Figura 48).



Figura 47: Primeros cuerpos fructíferos de *P. eryngii* a los 25 días.



Figura 48: Producción de carpóforos en paja de trigo.

3.6. Modelo de simulación para la producción de *Pleurotus eryngii*.

El modelo fue desarrollado para representar de forma virtual el proceso del cultivo de *Pleurotus eryngii* y simular la producción de hongos en un tiempo determinado.

Una vez ingresado los datos obtenidos en el laboratorio se procedió a la simulación del modelo descrito, que arrojó los siguientes esquemas. En la Figura 49 se muestran los componentes del modelo en donde las cajas representan los indicadores de estado, las flechas representan los flujos de materia que modifican la acumulación en las variables de estado. Las variables de estado representan los kilogramos de sustrato en cada etapa. Los flujos son las entradas y salidas de kilogramos de sustrato que pasan por cada variable de estado. Cada flujo está definido por variables auxiliares (representadas por círculos) como los kilogramos a procesar, los kilogramos perdidos por manejo, el número de bolsas, la contaminación, entre otros.

La unidad de tiempo definida para la simulación es de 28 días. Los valores iniciales en las variables de estado son igual a cero y en los flujos son a partir de las variables auxiliares.

El modelo determina la producción del hongo *Pleurotus eryngii* y mediante las variables aleatorias se observa como existe una disminución o aumento en la producción. En la Figura 50, se presentan las fórmulas aplicadas al modelo.

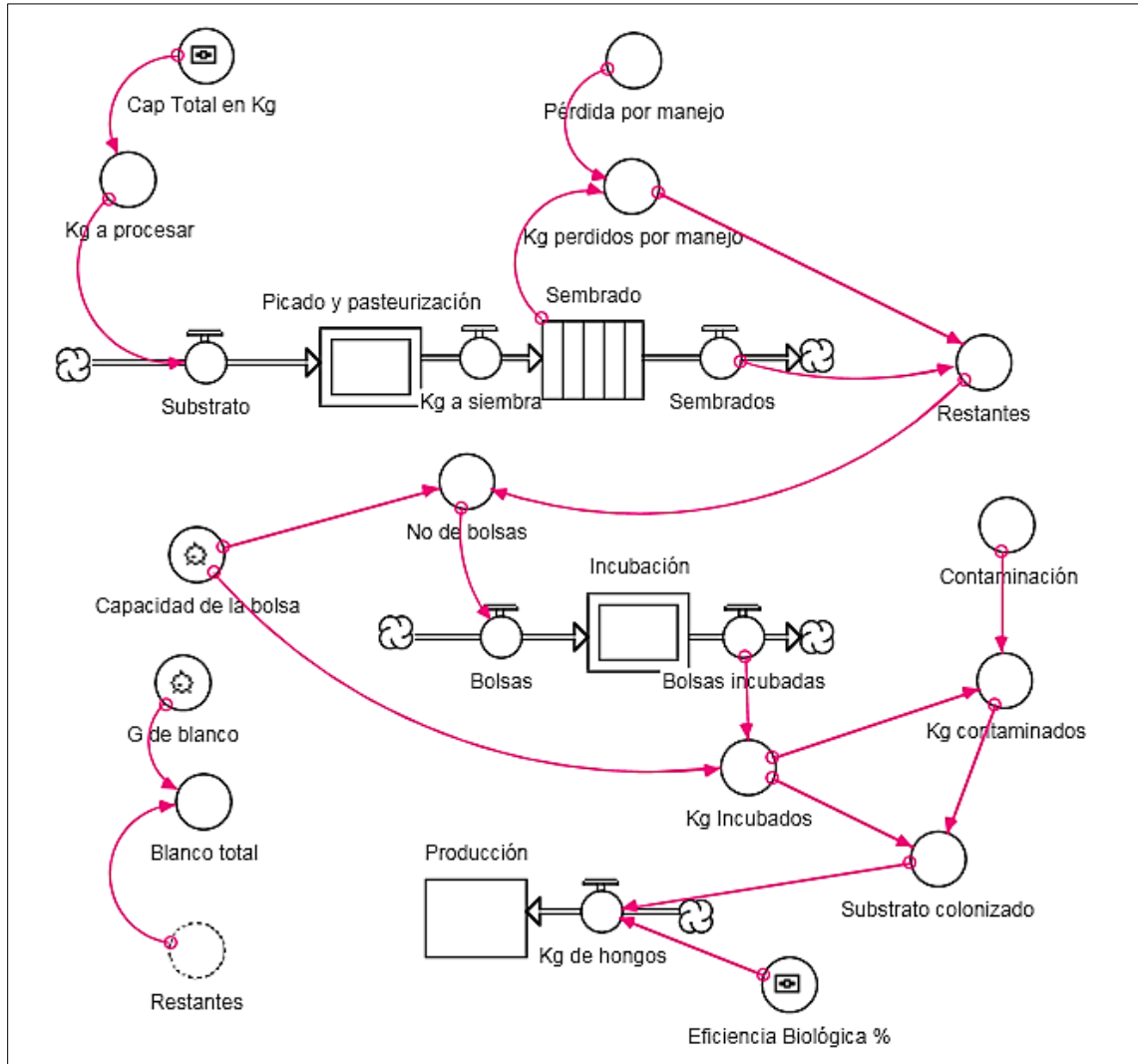


Figura 49: Componentes del modelo.

-
- ☐ Incubación(t) = Incubación(t - dt) + (Bolsas - Bolsas_incubadas) * dt
 - INIT Incubación = 0
 - COOK TIME = 21
 - CAPACITY = INF
 - FILL TIME = DT
 - INFLOWS:
 - ☞ Bolsas = IF(time=6)THEN(No_de_bolsas)ELSE(0)
 - OUTFLOWS:
 - ☞ Bolsas_incubadas = CONTENTS OF OVEN AFTER COOK TIME, ZERO OTHERWISE
 - ☐ Picado_y_pasteurización(t) = Picado_y_pasteurización(t - dt) + (Substrato - Kg_a_siembra) * dt
 - INIT Picado_y_pasteurización = 0
 - COOK TIME = 4
 - CAPACITY = INF
 - FILL TIME = DT
 - INFLOWS:
 - ☞ Substrato = Kg_a_procesar
 - OUTFLOWS:
 - ☞ Kg_a_siembra = CONTENTS OF OVEN AFTER COOK TIME, ZERO OTHERWISE
 - ☐ Producción(t) = Producción(t - dt) + (Kg_de_hongos) * dt
 - INIT Producción = 0
 - INFLOWS:
 - ☞ Kg_de_hongos = Substrato_colonizado*Eficiencia_Biológica_%
 - ▣ Sembrado(t) = Sembrado(t - dt) + (Kg_a_siembra - Sembrados) * dt
 - INIT Sembrado = 0
 - TRANSIT TIME = 1
 - INFLOW LIMIT = INF
 - CAPACITY = INF
 - INFLOWS:
 - ☞ Kg_a_siembra = CONTENTS OF OVEN AFTER COOK TIME, ZERO OTHERWISE
 - OUTFLOWS:
 - ☞ Sembrados = CONVEYOR OUTFLOW
 - Blanco_total = G_de_blanco*Restantes
 - Capacidad_de_la_bolsa = 5
 - Cap_Total_en_Kg = 10
 - Contaminación = RANDOM(.1,.25)
 - Eficiencia_Biológica_% = 0.6
 - G_de_blanco = 50
 - Kg_a_procesar = IF(TIME=1) THEN(Cap_Total_en_Kg)ELSE(0)
 - Kg_contaminados = Kg_Incubados*Contaminación
 - Kg_Incubados = Bolsas_Incubadas*Capacidad_de_la_bolsa
 - Kg_perdidos_por_manejo = Sembrado*Pérdida_por_manejo
 - No_de_bolsas = Restantes/Capacidad_de_la_bolsa
 - Pérdida_por_manejo = IF(time=3)THEN(random(0.02,0.05))ELSE(0)
 - Restantes = Sembrados-Kg_perdidos_por_manejo
 - Substrato_colonizado = Kg_Incubados-Kg_contaminados

Figura 50: Fórmulas aplicadas al modelo.

Componentes y funcionamiento del modelo:

Pantalla 1: El modelo inicia con la pantalla de interacción del usuario, el cual permite controlar distintas variables (Figura 51).

Pantalla 2: Se presentan los controles de cultivo para interacción del usuario. Sección de controles de cultivo: Cantidad total de kg de substrato que se puede incubar en el área de cultivo, capacidad de la bolsa en kg de substrato húmedo, gramos de blanco que se utilizan por kg de substrato y eficiencia biológica de la cepa (Figura 52).

Pantalla 3: Muestra los resultados en diferentes interfaces de cultivo, contaminación y producción, en graficas o tablas. En la interface de cultivo muestra el total de kg de hongos, la incubación y producción, en la interface de contaminación presenta los kg de substrato perdido por manejo y kg contaminados y en la interface de producción se observa los kg de substrato colonizado y la producción en kg de hongos.

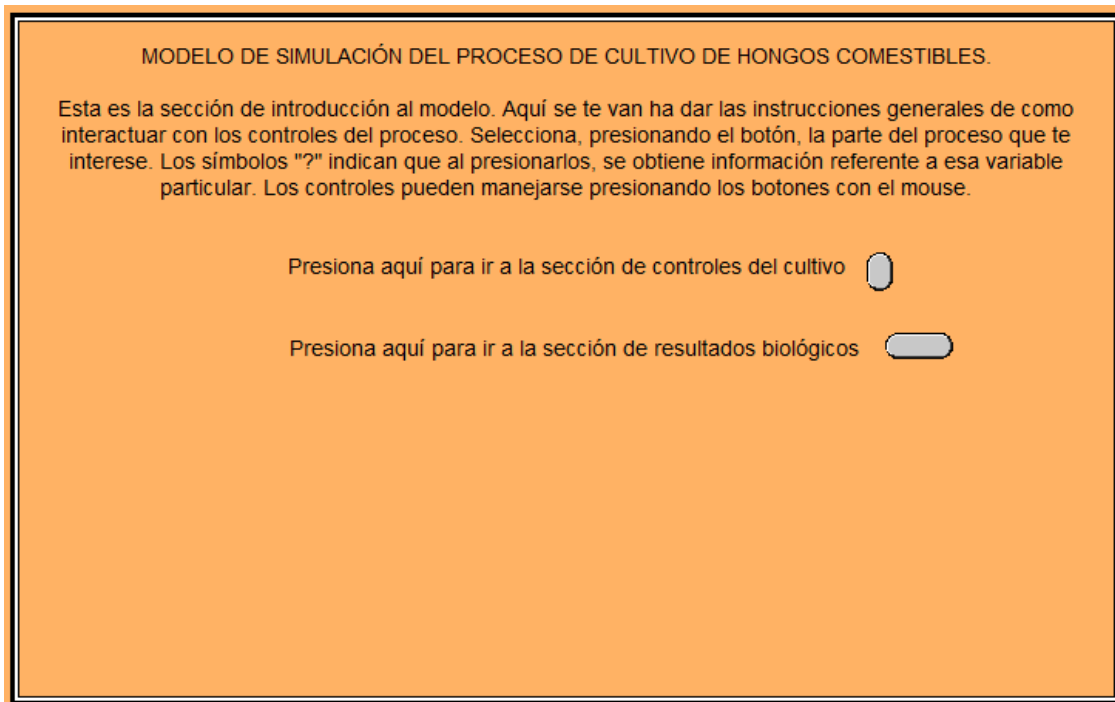


Figura 51: Pantalla 1: Interacción del usuario. Tomado de Eaton (2014).

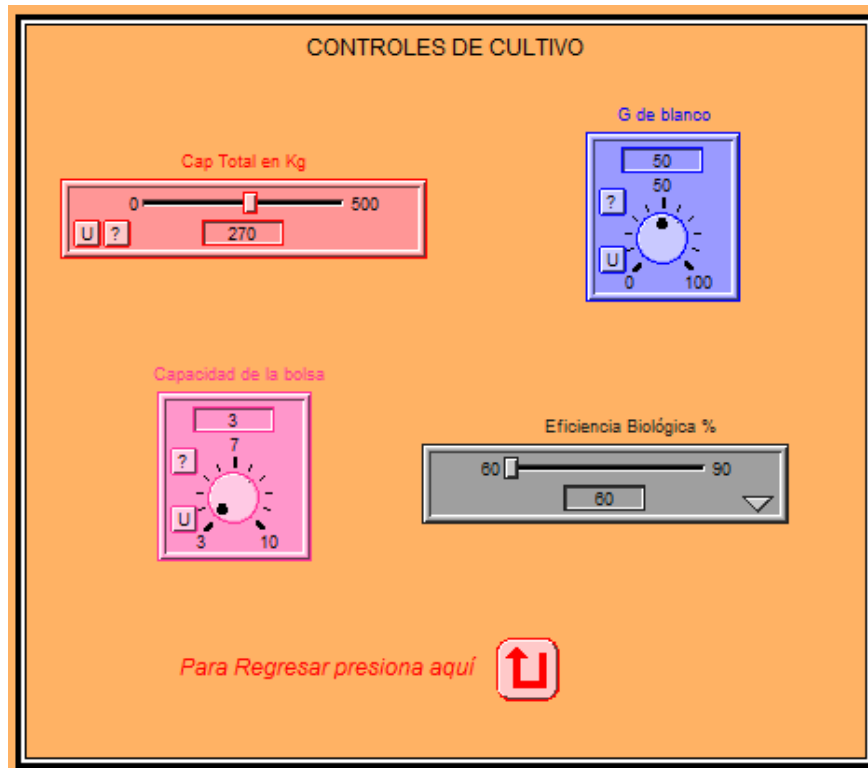


Figura 52: Pantalla 2: Controles de cultivo. Tomado de Eaton (2014).

En las pantallas siguientes se muestran los resultados de la simulación con los siguientes datos: 270 kg a procesar, 50 gramos de blanco, 3 kg de capacidad de la bolsa y una eficiencia biológica de 60%.

El resultado de la interfase de cultivo, indica en el eje de las "X" el número de días y en el eje de las "Y" los kg a siembra (270), el periodo de incubación a partir del sexto día al 28 y el inicio de la producción el día 27 (Figura 53). En la Figura 54, se muestra la contaminación en donde no se reflejan kg perdidos por manejo, la contaminación es variable y los kg contaminados son 61. En la siguiente interface se muestra de forma comparativa dos corridas de la variable de contaminación y cómo la función "random" arroja distintos valores aleatorios (Figura 55), y finalmente la interface de producción indica la cantidad de 209 kg de substrato colonizado y 125.40 kg de hongos producidos (Figura 56).

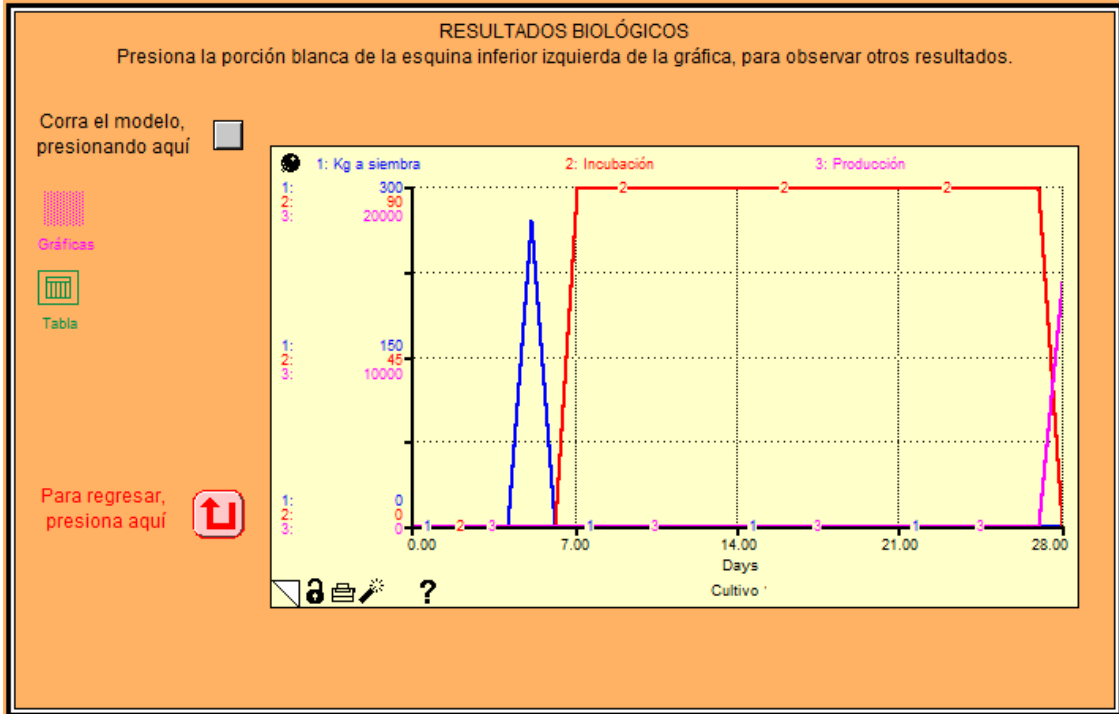


Figura 53: Interfase de cultivo.

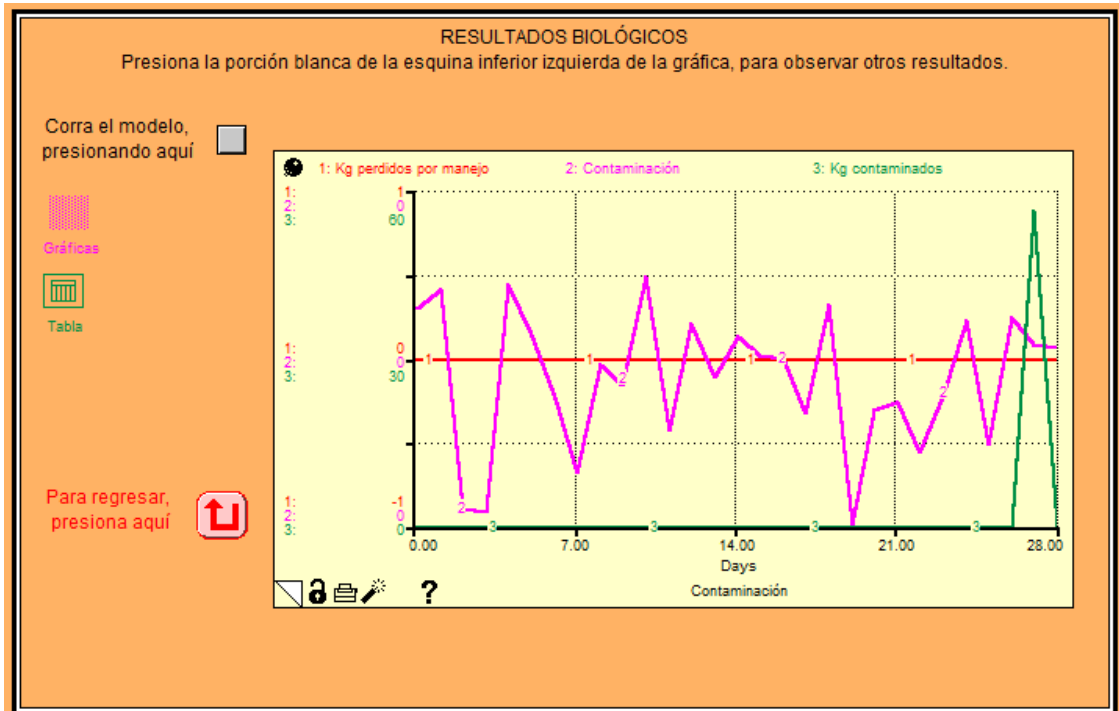


Figura 54: Interfase de contaminación.

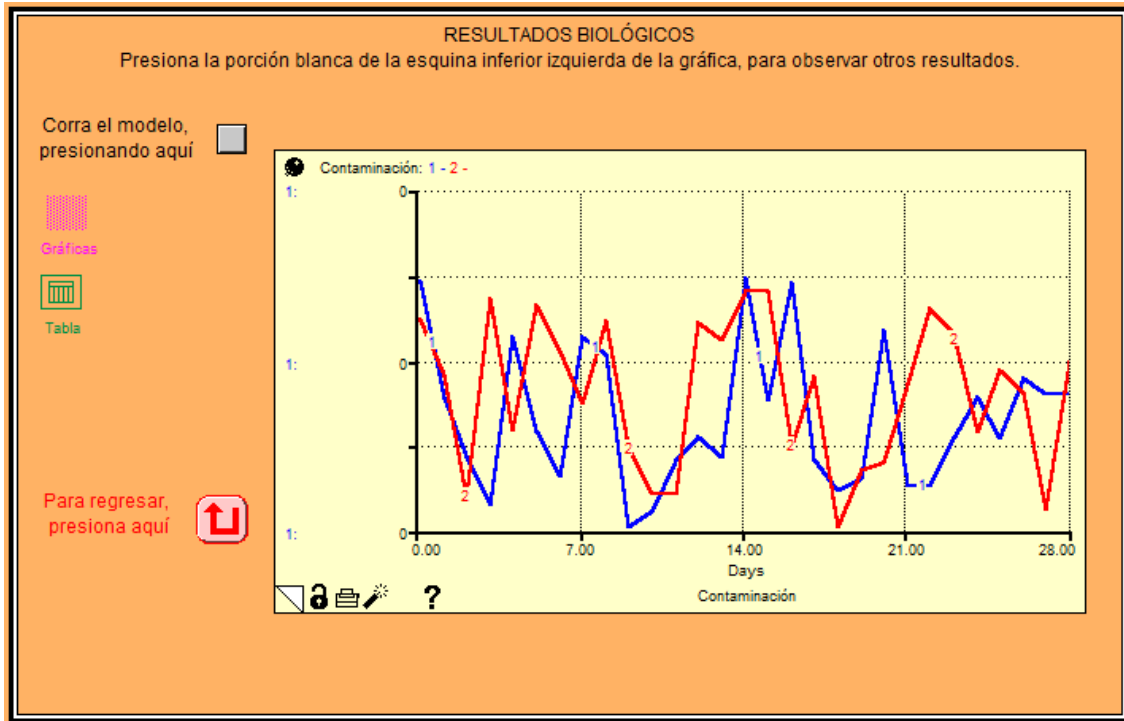


Figura 55: Interfase de contaminación comparativa.

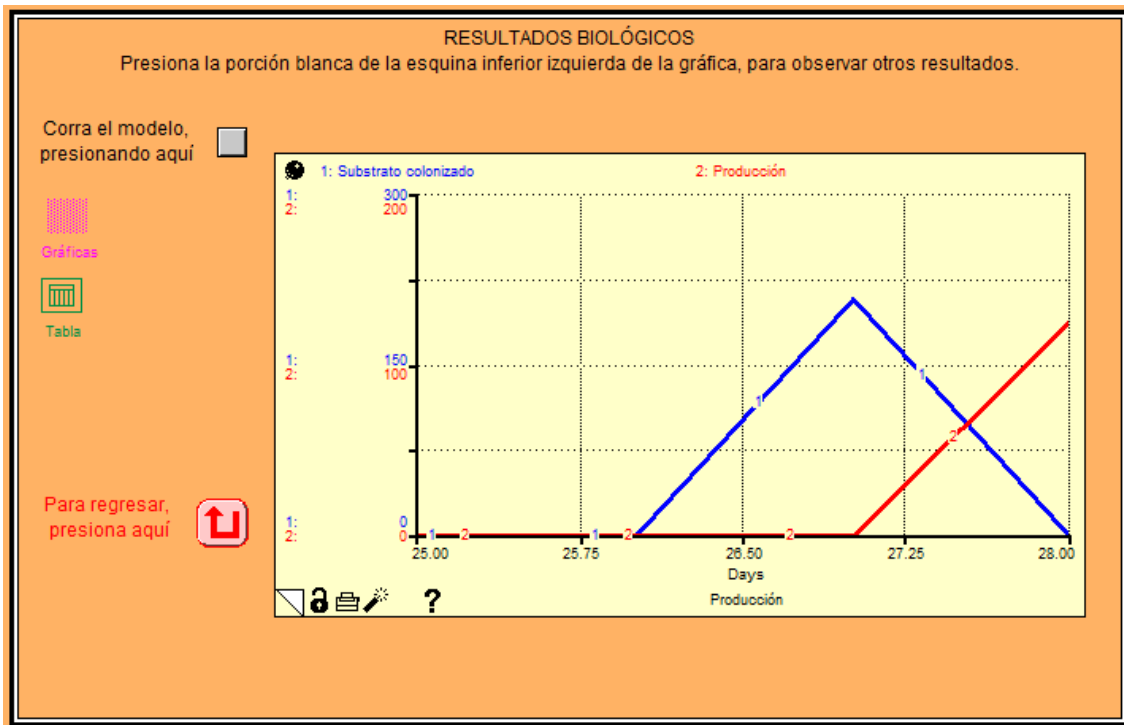


Figura 56: Interfase de producción.

GGATGTGTGTGTGTGGGGGGCGTGTGTGTGTTTGGTGTCTCTGTGCGGCGTGCGCTCGGGCGACG
TATGACGAGAGAGAGAAAATAGATCAGGAGAGCACGGCGACGGTCGGGATAGTAGGGTAGCGCGCT
CGCGATTACCAGCACGCGGACTAGACCGACGGTCGAGATACGTACAGNCAG

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

Micelio Primario.

De los cuatro medios de cultivo utilizados, los que registraron mayores velocidades de crecimiento fue el de agar de dextrosa y papa (PDA) seguido por agar extracto de malta (EMA) a una temperatura de 25°C, resultados similares a los de Andrino et al. (2011), que registraron mayor velocidad de crecimiento micelial a 21°C en estos mismos medios. Ambos medios parecen tener una similitud en las características miceliales que producen, siendo estas equiparables en cuanto a calidad (velocidad de crecimiento, densidad, apariencia y arraigo). Se sabe que el PDA es uno de los medios de cultivo más utilizados para la conservación de hongos (cepas). El contenido de nutrientes de este medio de cultivo propicia un adecuado desarrollo del micelio ya que la infusión de papa es la fuente de almidón, lignina y minerales, mientras que la dextrosa (glucosa) es la principal fuente de carbono para el crecimiento del hongo. El extracto de malta agar contiene también como principal fuente de carbohidratos a la maltosa, la dextrosa y al glicerol, pero como fuente principal de nitrógeno contiene a la peptona (DIBICO, 2010). Este medio de cultivo pudiera ser una segunda opción al no contar con PDA, ya que el crecimiento es un poco más lento (dos días más).

Respecto al agar dextrosa sabouraud en el que se observó una capacidad de colonización en nueve días contra el de PDA que creció en siete, el desarrollo del micelio fue semi-denso, algo rizomórfico y heterogéneo. Si bien, el contenido de peptonas proporciona elementos de crecimiento y fuente de nitrógeno y la dextrosa suministra fuente de energía, este medio es frecuentemente utilizado para el conteo de hongos en el laboratorio y particularmente para hongos dermatofitos (BD©, 2007).

Finalmente el medio de agar harina de maíz fue el que tuvo un resultado menos favorecedor ya que el crecimiento del micelio fue muy débil, aun cuando, la infusión de harina de maíz contiene: nitrógeno, vitaminas y almidón como fuente de carbono (Arenas, 2013). Sin embargo se deduce que no fueron suficientes para producir un micelio denso. Este medio es utilizado para la producción de clamidosporas, las cuales

son favorecidas su producción en medios empobrecidos, por lo que no se recomienda el uso de este medio para hongos de la pudrición blanca.

En cuanto a las características morfológicas del micelio los datos coinciden con Gaitán-Hernández (2005) y Stamets (1993), quienes obtienen un micelio algodonoso, de color blanco y densidad regular.

En cuanto a la contaminación del 30% en agar dextrosa sabouraud se asume que pudo deberse a la disminución de las condiciones de asepsia en el área de trabajo.

Micelio Secundario.

Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con 24 h de inmersión en agua y con cocción. En el caso del grano de trigo no hubo diferencias en resultados cuando se utilizó el grano con y sin cocción previa. El grano de alpiste fue el que mostró un mayor crecimiento micelial, sin embargo el micelio no fue tan fuerte comparado con el de trigo siendo más débil y menos denso.

De los granos utilizados, el de trigo es el mejor grano para la producción de micelio de *P. eryngii*, lo que concuerda con Stamets (1993), quién menciona que los mejores cereales son: centeno, trigo, sorgo y mijo, sin embargo en este estudio el mijo no pareció ser un buen elemento para el desarrollo del hongo, al igual que el grano de alpiste por su debilidad en el desarrollo del micelio. A pesar de que estos granos tienen alto contenido en carbohidratos y proteínas y el mijo particularmente es rico en fibra, la falta de crecimiento o debilidad en el micelio se pudo haber debido a la cantidad de agua, es decir, les faltó más tiempo de inmersión para poder absorber mayor humedad y poder ablandar las paredes del grano para que el hongo pudiera penetrar con mayor facilidad. Por otro lado el tiempo de cocción pudo también haber influido en que las paredes de los granos no se debilitaran lo suficiente para permitir la entrada del micelio y su posterior desarrollo (Suárez, 2010).

En cambio el grano de trigo pareció haber absorbido la humedad necesaria, tener el tiempo suficiente de cocción más el contenido de almidones de fácil rompimiento, el

contenido de lignina y celulosa, entre otros, permitieron un desarrollo favorable del hongo.

Finalmente parece ser importante que el grano que se utilice se sumerja en agua durante 24 horas para que pueda absorber la humedad necesaria, agregar la cantidad suficiente de carbonato de calcio o sulfato de calcio (yeso) para conseguir un pH de 6.5 y evitar la aparición de agentes contaminantes y por último proporcionar el tiempo adecuado de cocción en los granos.

Micelio terciario (substratos).

De los substratos probados, el rastrojo de chícharo (RC) fue el medio en el que se obtuvo mayor velocidad de colonización por parte del micelio de *P. eryngii* con tan solo ocho días en la colonización total, probablemente debido al contenido de proteínas de 6.1%, 1.6% de grasas, 33.1% de fibras y 5.4% de minerales (Stamets, 1993), por lo que este substrato sugiere una fuente importante de nutrientes para este hongo. Lo anterior aunado a su significativo contenido de celulosa. Es importante resaltar que el crecimiento micelial fue abundante y denso, lo que sugiere un micelio sano. Sin embargo como menciona Oei (1991), hay que considerar que un rápido crecimiento micelial no necesariamente corresponde a una mayor producción de cuerpos fructíferos porque los requerimientos nutritivos varían según la etapa del cultivo, a pesar de esto el rastrojo de chícharo tiene potencial para ser un substrato para el cultivo de esta especie, teniendo como antecedente que ya que se ha utilizado para *Pleurotus* (Sohi *et al.*, 1989).

Respecto a la tasa de crecimiento, los substratos que siguieron en velocidad de colonización, fueron el bagazo de algas y de tomate que permitieron la colonización del hongo en once días pero sufrieron contaminación debido a su alta capacidad de absorción de agua, lo que sugiere que también afectó al crecimiento de *P. eryngii* en dicho substrato, que fue débil, por lo que se considera que estos substratos pudieran funcionar como suplemento con otro material.

En el caso específico del bagazo de algas, se cree que el micelio superficial raquítico presentado, no pudo desarrollarse de manera óptima, por la carencia de nutrientes ya

que en este residuo de algas no se encuentra el agar, elemento que es extraído por la industria precisamente para la obtención de agar-agar. Como residuo del proceso de extracción del agar, el bagazo representa entre el 60-70% del peso fresco de las algas y se caracteriza por altos contenidos de fibra, proteína cruda y sales minerales (Bravo *et al.*, 1998), los cuales no parecieron ser nutrientes suficientes para el crecimiento del hongo y si para hongos competidores como *Aspergillus spp.*.

La fibra de coco, la fibra de yuca y la paja de trigo necesitaron de catorce días para que el hongo colonizara los substratos. La porosidad de la fibra de coco, parece tener influencia en su capacidad de retención de agua y en el facilitar una buena aireación, por otra parte este substrato contiene del 65-70% de lignina, del 20-30% de celulosa y una relación C/N 80:1. El análisis de DRX arrojó el contenido de celulosa alfa. No obstante el micelio fue denso inicialmente y posteriormente superficial y escaso.

Este substrato presentó la formación de primordios a los 35 días de ser inoculados (Figuras 38 y 39). La medula de la fibra de coco, es composteada y utilizada para el cultivo de *Pleurotus* o *Volvariella* en la India (Theradi, 1992).

En el caso de la fibra de yuca, su estructura compuesta por pequeñas fibrillas y poros pudieran contribuir a la retención de agua y aeración como se indicó anteriormente (Figura 45). El contenido de celulosa beta y almidón parece ser para el desarrollo de esta especie, una fuente importante de carbohidratos. Por otra parte este sustrato cuenta con un 6.6% de proteínas, 2.2% de grasas, 38.6% de fibra, y 6.9% de minerales (Stamets, 1993), este mismo autor menciona que las plantas resistentes a las sequias incluidas la yuca, el agave y el cactus son útiles como componentes de substratos para hongos.

Además de esto, el extracto de la yuca por su alto contenido de saponinas es utilizada para tratar trastornos antiinflamatorios, dolor de cabeza, gonorrea, artritis y reumatismo (Piacente *et al.*, 2005). Es utilizada también en la industria de los alimentos, medicamentos y cosméticos (López, 2010) y particularmente se utiliza como aditivo alimenticio para el ganado porque disminuye la concentración de amoniaco en rumiantes, mejora la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia en los animales

(Kawai *et al.*, 2000). Además las sustancias de esta especie poseen la cualidad de ser un antifúngico natural por lo que en altas concentraciones no permite el desarrollo del micelio (Castellon, 2003), pero a concentraciones medias de saponinas retardan, más no inhiben el desarrollo del micelio como lo comprobó Díaz (2005) al utilizarlo como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus*. Al igual que la fibra de coco, este sustrato presentó primordios (Figuras 37 y 40), pero a diferencia del sustrato anterior el micelio fue más denso y rizomórfico.

El contenido de 3.9% de proteína, 1.5% grasas, 36.9% de fibras, 8.3% de minerales (Stamets, 1993) y 13% de lignina, 39% hemicelulosa, 40% celulosa (Poppe, 2005) en la paja de trigo hacen que sea uno de los sustratos más utilizados para el cultivo de hongos comestibles ya sea sola o combinada.

La ventaja de utilizar este sustrato es su amplia disponibilidad a nivel mundial. En México, el cultivo de trigo ocupa el 5% de superficie sembrada, por lo que se producen 4 millones 407,436 toneladas de rastrojo (Reyes-Muro, 2013). Baja California ocupa el tercer lugar en producción de trigo con un 14.3% (SIACON-SIAP, 2011 en Reyes-Muro, 2013). Stamets (1993) señala que la paja de trigo cuenta con un diámetro de eje ideal que favorece selectivamente las células filamentosas de la mayoría de los hongos. Este fue el único material que se utilizó como sustrato para la producción de carpóforos en este estudio.

Por último, en el caso de la vid molida, no se ha encontrado una explicación del por qué el desarrollo micelial se inhibió, aun cuando en dos de diez réplicas se desarrolló bien, sin embargo en un momento se detuvo y en el resto de las réplicas no creció, en la literatura no se ha encontrado información que apoye esta observación.

La cascarilla de algodón es otro de los sustratos con buenos resultados observados en el presente estudio, cuenta con un 3.9% de proteína, 0.9 de grasas, 46.1% de fibra y 2.6% de minerales (Stamets, 1993). Resulta interesante que la literatura recomienda que para el cultivo de *P. eryngii* en paja de trigo, se adicione de 5 a 10% de harina de semilla de algodón para mejorar el rendimiento (Upadhyay y Vijay, 1991). Poppe (2005) reporta que el residuo de algodón propicia una eficiencia biológica de 56-86% para

Pleurotus. Aunado a esto, el desarrollo y morfología del micelio parece indicar que puede considerarse un buen sustrato para el cultivo de este hongo. La cascara de semilla de algodón (*Gossypium hirsutum*), fue el mejor sustrato para el cultivo de *Pleurotus* sin ningún tratamiento térmico (Sun y Yu, 1989). El residuo del algodón contiene cantidades variables (0.25 a 1.45%) de nitrógeno total (Chang-Ho y Ho, 1979).

Las características morfológicas de la cascarrilla de algodón, observadas a través de microscopía electrónica de barrido, señalan una superficie rugosa y la formación de unos hilillos, que a mayores aumentos de observación, se aprecian como unas fibrillas paralelamente dispuestas y algunas entretrejidas (Figura 46), lo que podría influir en darle una mayor superficie de colonización al hongo.

Por el contrario en la malta agotada, el sustrato fue invadido por hongos contaminantes que se cree fue por el exceso de humedad, lo que inhibió el crecimiento de *P. eryngii*. El bagazo de cerveza se ha utilizado para el cultivo de esta especie por Andrino et al., (2011), donde se mencionan las eficiencias biológicas obtenidas más adelante.

Finalmente, el sustrato agotado del cultivo de hongos comestibles, puede ser utilizado como alimento para el ganado con ahorros significativos, ya que la fibra de la paja se ha solubilizado ampliamente, por lo que es posible que los animales la consuman y la aprovechen más eficientemente, obteniendo resultados favorables como la ganancia de peso en los animales (SAGARPA, 2007).

En países como España el residuo se utiliza como compostaje para producir enmiendas orgánicas que puedan aplicarse al suelo como fuente de materia orgánica (Moreno et al., 2014). De acuerdo con Rinker (2002), por las características que presentan estos sustratos agotados, pueden ser utilizados en la biorremediación de suelos contaminados, de aire, de agua, etc. Y también pueden ser empleados como sustratos alternativos en cultivos ornamentales, hortalizas, semilleros, o como sustrato para el cultivo de otras especies de hongos.

Eficiencia Biológica.

En este estudio se obtuvo una E.B de 65.56% y un rendimiento de 39.33% en paja de trigo con un ciclo de 28 días y dos cosechas, comparado con Gaitán-Hernández (2005) quien reporta una E.B de 57.58% para la cepa 688 y 49.57% para la cepa 689 con un rendimiento de 17.27 y 14.87 respectivamente utilizando como substrato paja de cebada y polvo de madera de encino como suplemento, produciendo dos cosechas dentro de 48 días. Mientras que Andrino et al., (2011), reporta una E.B de 87.35% para la cepa PLERPER y un ciclo de 83 días con dos cosechas, 77.48% de E.B para la cepa PLERCOM y ciclo de 61 días con una cosecha y 41.02% de E.B con un ciclo de 90 días para la cepa PLERSE y dos cosechas, utilizando como substrato bagazo de cerveza en frascos de vidrio para *P. eryngii* (Fries) Quélet. Villaseñor-Ibarra et al., (1998), utilizaron bagazo de maguey tequilero (pasteurizado) obteniendo una E.B de 38%. Otro estudio realizado por Peng et al., (2000) para *P. eryngii*, reportan una E.B de 86.74% para la cepa Holland 150, utilizando aserrín suplementado con un 38% de salvado de arroz en frascos de plástico durante 46 días. Hassan et al., (2010), obtienen eficiencias biológicas de 45.71 a 65.22% utilizando bagazo de caña de azúcar y aserrín, pasando por paja de soya y paja de arroz. Kirbag y Akyuz (2008) consiguen una E.B de 85.2% en paja de trigo y paja de mijo (1:1)+10% de salvado de arroz, requiriendo de 54.8 días y E.B similares a las de este estudio, se obtuvieron con paja de trigo + 10% de salvado de arroz (42.2 días) y paja de trigo y tallo de frijol (1:1)+20% de salvado de arroz (48.6 días). Otro estudio de estos autores reportan una E.B de 77.2% en paja de trigo y tallo de algodón (1:1)+20% de salvado de arroz, con un periodo de cosechas de 120 días para *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. ferulae Lanzi (Kirbag y Akyuz, 2008b). Akyuz y Yildiz (2008), logran una E.B de 93% en paja de trigo y paja de soya (1:1)+ 5% de salvado de arroz para esta especie, con un periodo de 100 días y dos cosechas. Moreno et al., (2009), obtiene una E.B de 42.7% en paja de trigo pasteurizada y 28% en paja de trigo cocida en un periodo de 60-70 días.

Como se puede observar las diferencias de la E.B varían según los tratamientos utilizados, substratos utilizados, mezclas utilizadas, y la disponibilidad de los mismos

según la región. La E.B obtenida en este estudio se considera dentro de un rango aceptable considerando las condiciones y sobre todos los días de cosecha que en este estudio fueron alrededor de 28 días mientras que en otros estudios rondan desde los 48 hasta los 100 días, aunque para esta especie Stamets (1993), cita 45 días de ciclo con 14 días entre dos cosechas. No obstante, 250% de E.B es excepcional, un buen productor debe operar dentro del rango de 75 a 125% de E.B (Stamets, 1993).

Cuerpos fructíferos.

De acuerdo a Hassan et al., (2010), reportan un promedio de peso de los cuerpos fructíferos de 20-70 g, lo que difiere un poco con este estudio (35-130 g), obtienen un diámetro del píleo de 4-9 cm, en este estudio (3.30-11 cm) lo que coincide con Stamets (1993), una longitud del estípite de 3-8 cm, similar a lo de Stamets (1993) y diferente de este estudio fue de 5-16 cm y un diámetro variado de 1.5 a 3 cm, en este estudio fue de 1.50-3.90 cm. Las características del hongo en general concuerdan con lo reportado por estos autores.

Modelo de simulación.

Los resultados obtenidos en el modelo son muy generales, ya que las variables ingresadas son las más básicas y esenciales. Es posible alimentar el modelo con variables más técnicas, de tipo abióticas como la temperatura, el porcentaje de humedad relativa, la cantidad y periodos de luz y oscuridad, la cantidad de CO₂, el tiempo y cortes de la bolsa, y variables bióticas como la incidencia de contaminantes, plagas e insectos. También podrían integrarse variables de tipo económico-financieras. Las distintas corridas o simulaciones que se pueden realizar a través del programa permiten visualizar y comprender lo que está sucediendo con las variables que están siendo utilizadas. El modelo le permite al usuario elegir solo las variables con las que desea trabajar ya sea para visualizarlas en graficas o tablas.

La plataforma del modelo permite interactuar con el usuario al hacer preguntas de tipo ¿Qué pasa si.....?, es decir, si aumentó la producción, ¿hay más contaminación?, ¿en qué momento se produce más contaminación? y así poder incidir en la producción y/o tener más cuidado en esa etapa del proceso.

Para desarrollar un modelo más completo y cercano a la realidad, es importante llevar a cabo o contar con una bitácora en donde se obtengan datos de varias cosechas para obtener promedios, agregarlos y poder evaluar al modelo y saber qué tan acertado está de la realidad tal como lo sugiere Grant et al.,(2001).

Finalmente el uso del programa STELLA, se recomienda para este tipo de actividades ya que permite desde el inicio conceptualizar el proceso, visualizar las entradas y salidas del sistema así como las variables que alimentan las distintas etapas y el manejo de las interfaces resulta fácil.

Identificación molecular.

En el 2010, Ahmadi et al., desarrollaron un estudio sobre las relaciones filogenéticas y de clasificación, de las especies comestibles del grupo de los basidiomicetos.

Sin duda alguna, los análisis moleculares demuestran que en realidad se ha trabajado con cepas de *P. eryngii*, y que no se trata de alguna contaminación que resultan ser muy comunes en esta clase de trabajos. No obstante el alineamiento de secuencias muestra valores similares con secuencias de *P. eryngii* var. *ferulae*, reportadas por Huang et al.,(2013). Sin embargo este último taxón, se caracteriza por presentar basidiomas de mayor tamaño que la var. *eryngii* (Calonge, 2009), lo cual no concuerda con las fructificaciones que se han obtenido de la cepa, por tal motivo se ha decidido dejar esta especie como *P. eryngii*.

5. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo idóneo para la producción de micelio primario es agar de dextrosa y papa (PDA) con una tasa de crecimiento de 16.21 mm y promedio de 2.32 mm/día requiriendo de siete días y agar extracto de malta (EMA) con una tasa de crecimiento de 17.10 mm con promedio de 1.90 mm/día.
- El medio idóneo para la producción de micelio secundario es el grano de trigo con una velocidad de crecimiento de 38.75 mm y promedio de 6.46 mm/día a través del tratamiento con 24 h de inmersión en agua y cocción de 5-15 minutos.
- Los substratos con mayor viabilidad biológica para la producción de *P. eryngii* son el rastrojo de chícharo al completar su crecimiento en ocho días, seguido por la fibra de coco, la fibra de yuca y la paja de trigo al completar su desarrollo a los 14 días. Las dos fibras formaron primordios.
- La paja de trigo registró una eficiencia biológica de 65.56% y un rendimiento de 39.33%.
- Las técnicas de caracterización física que se aplicaron a todas las muestras corroboran de que se trata de fibras naturales con alto contenido de celulosa. En particular, la cascarilla de algodón y la fibra de coco contiene celulosa alfa, mientras que la fibra de yuca contiene celulosa alfa y celulosa beta y también mayor cantidad de almidón.
- La pureza de la celulosa hallada en los substratos los convierte en potenciales candidatos para ser utilizados en la fabricación de películas con fines de recubrimiento de alimentos por ejemplo, o en la fabricación materiales compuestos utilizados en la medicina. Esta investigación abre posibilidades de utilización de residuos agroindustriales de esta naturaleza.
- El modelo de simulación en el *software* STELLA permite visualizar de manera conceptual las entradas y salidas del proceso de cultivo de hongos así como las variables que lo alimentan.
- El modelo es perfectible para futuros usos según las variables recomendadas.
- El modelo puede ser una opción para que los cultivadores de hongos interesados proyecten y/o planifiquen sus esquemas de producción y una herramienta de capacitación.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos a mayor escala utilizando como substrato la cascarilla de algodón, la fibra de coco, la fibra de yuca y el rastrojo de chícharo.
- Tener especial cuidado con los bagazos ya que son más propensos a la contaminación.
- Realizar combinaciones o mezclas de diferentes proporciones utilizando los substratos de este estudio.
- Realizar un estudio de mercado para conocer la viabilidad del producto así como su posible oferta-demanda.
- Alimentar el modelo con variables técnicas y económicas y ajustar las ya incluidas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
2. Ahmadi, A., Bhassu F. S. y Sabaratnam, V. (2010). Phylogenetic relationships and classification of selected edible basidiomycetes species using internal transcribed spacer region I and II. *Biological Sciences, Genetic and Molecular Biology*, University of Malaya, Malaysia.
3. Akyuz, M. y Yildiz, A. (2008). Evaluation of cellulosic wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (10), pp. 1494-1499.
4. Andrino, A., Morte, A. y Honrubia, M. (2011). Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología*, pp. 53-66.
5. Arenas, G.R. (2013). *Micología médica ilustrada*. 4ed. McGraw Hill, México. 417 pp.
6. Ayala, N. (2014). Facultad de Ciencias; Comunicación personal.
7. Barbado, J.L. (2003). *Hongos comestibles*, 1ed., Albatros, Buenos Aires. 192 pp.
8. BD© (2007). BBL Sabouraud dextrose agar. Becton, Dickinson and company, Maryland, USA.
9. Bravo, O. M., Llamozas de Colman B. y Maldonado C. (1998). Protein enrichment of algae bagasse by solid-state fermentation. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulla*. Vol. 21, N° 3,188-194.
10. Chang, S. T. & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. *CRC Press, Boca Raton*, p. 451.
11. Chang-Ho, Y., y Ho, T.M. (1979). Effect of nitrogen amendment on the growth of *Volvariella volvacea*. *Mushroom Science* (10)1:619-625.
12. Cohen, R., Persky, L. & Hadar, Y. (2002). Bioechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 58, pp. 582-594.

13. Del Carmen, P. F. & Ramírez, G. A. (1997). Guía para la Producción de Hongos Seta (*Pleurotus* spp.), México: s.n.
14. DIBICO. (2010). Agar extracto de malta, Medio de cultivo, catálogo 1118. DIBICO S.A. de C.V., México D.F.
15. Díaz-Vázquez, J. (2005). Comportamiento de *Pleurotus ostreatus* cultivado en sustrato de *Yucca schidigera*. Tesis Profesional. UABC. Ensenada B. C.
16. Eaton, G.R. (2014). Modelo de Simulación Aplicado para la Capacitación en el Cultivo de Hongos Comestibles. Consulta de borrador para publicación.
17. Espitia, S. H. (2010). Aislamiento de nanofibras de celulosa a partir de residuos agroindustriales de fique y caña de azúcar, con potencial aplicación en reforzamiento de polímeros termoplásticos. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
18. Gaitán- Hernández, R. (2005). Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología*, Diciembre, Volumen 021, pp. 77-84.
19. Gaitán- Hernández, R., Salmenes, D., Pérez Merlo, R. & Mata, G. (2006). Manual Práctico de Setas: Aislamiento, siembra y producción. 1era ed. Xalapa(Veracruz): Instituto de Ecología A.C.
20. Grant, W.E., Marín, S.L., y Pedersen, E.K. (2001). Ecología y Manejo de Recursos Naturales: Análisis de Sistemas y Simulación. San José, Costa Rica: AGROAMERICA. 340pp.
21. Hassan, F.R.H., Medany G.M y Abou Hussein S.D. (2010). Cultivation of the King Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii*) in Egypt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(1): 99-105.
22. Huang, L.H., Wu, Q.P. and Yang, X.B. (2008). Phylogenetic relationships of cultivated edible fungus based on evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Detection Team, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, China.
23. Jorgensen, S.E., y Bendoricchio, G. (2001). Fundamentals of Ecological Modelling. ELSEVIER. 530pp.

24. Kirbag, S. y Akyuz, M. (2008). Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.6 (3y4): 402-305.
25. Kirbag, S. y Akyuz, M. (2008b). Evaluation of agricultural wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20), pp. 3660-3664.
26. Kawai, M., Sato T, Kimura A, Takahashi J y Matsuoka S. (2000). Effect of *Yucca schidigera* on nitrogen and energy balance in sheep fed alfalfa or grass silage. Asian-Aus. J. Anim. Sci. C: 218.
27. Laércio, L. V., y Ghini, R. (1999). A mathematical model for fungal population growth and the fungicide resistance problem. Journal of Biological Systems. 07(02): 239-249.
28. Lamour A., Van den Bosch F., Termorshuizen AJ., Jeger, MJ. (2001). Modelling the growth of soil-borne fungi in response to carbon and nitrogen. IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology. 18(2):329-46. Lizárraga Escobar M. (1993). Eficiencia Biológica, Biometría y Análisis Nutricional de *Pleurotus ostreatus*, (Jacquin ex Fr.) Kummer, (cepa sin esporas), sobre desechos agrícolas de Baja California. Tesis Profesional. UABC. Ensenada B.C.
29. López Alonzo C.V., Martínez Villavicencio N., Basurto Sotelo M. y Pérez Leal R. (2010). Los compuestos esteroidales o saponinas en la palma del desierto (*Yucca schidigera*) y sus aplicaciones. Revista Synthesis No. 55. Universidad Autónoma de Chihuahua. Pp. 16-18.
30. Marín, H.V., y Delgado, E.L. (1999). La Antártica: ecología, recursos y sustentabilidad. Ed. Universitaria. Chile. 90pp.
31. Martínez-Carrera, D. y López-Martínez de Alva, L. (2010). Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: Exitos y fracasos durante el periodo 1991-2009. En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (eds). *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, p. 648.

32. Martínez, C. y Guzmán, G. (1984). Investigación y prospectos sobre el cultivo de hongos comestibles en México, s.l.: Memorias del simposium sobre el cultivo de hongos comestibles, Puebla, México.
33. Martínez, S. T., y Soto, C. Y. (1993). Extracción de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 22, 79-88.
34. Molina, M. y Giannuzzi, L. (1999). Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food Research International*, 32(10):677–682.
35. Mora, V. M. y D. Martínez-Carrera. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. Capítulo 1.1, pp. 7-26. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
36. Moreno, J., García-Morales, J.L., Pascual, J.A., Bernal, M.P., (Edit. Cient.). (2014). Residuos agrícolas I.1 Vol. 1 de: De residuo a recurso: Recursos orgánicos. Edit. Mundi-Prensa. 257pp.
37. Moreno, R.P., Pinochet, T.D., y Valenzuela, F.E. (2009). Determinación de la eficiencia de dos tratamientos térmicos usados en paja de trigo para el cultivo de *Pleurotus eryngii*. *Boletín Micológico* Vol. 24:71-76.
38. Oei, P. (1991). Manual on mushroom cultivation: techniques, species and opportunities for commercial application in developing countries. TOOL Foundation, Amsterdam. 249 pp.
39. Peng J.T., Lee C.M. y Tsai Y.F. (2000). Effect of rice bran on the production of different king oyster mushroom strain during bottle cultivation. *Journal of Agriculture Research of China* 49: 60-67.
40. Peña, P.A. y Hernández R., J. (2004). Emulación del crecimiento de hongos comestibles y medicinales utilizando un algoritmo evolutivo con un operador genético de tipo cilíndrico. *Revista Colombiana de Computación*.5 (2).
41. Piacente, S., Pizza, C. y Oleszek, W. (2005). Saponins and Phenolics of *Yucca Schidigera* Roetzl: Chemistry and Bioactivity, en revista *PhytochemistryReviews*, n. 4, pp. 177-190.
42. Pongrácz, E. (2004). Industrial ecosystems, by-product synergies, Oulu University: s.n.

43. Poppe J. (2005). Cultivo del hongo ostra parte II: Hongos Ostra. Cap.5: Sustrato del libro: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del Hongo Ostra. Mushworld. 83-93pp.
44. Rey, A., Garea, M. y Lago, J. C. (2007). Glosario Micológico. s.l.:s.n.
45. Reyes-Muro, L., Camacho-Villa T. C. y Guevara-Hernández F. (Coords.). (2013). Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Núm. 7. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. i-viii. 242 p.
46. Rinker, D. L., (2002). Handling and using “spent” mushroom substrate around the world. En: J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (Eds), Proceed. of the fourth Int. Conf. Mush. Biol. Mush. Products. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, 43-60.
47. Rowan, Neil, Johnstone C.M., McLean R.C., Anderson J.G., y Clarke J.A. (1999). Prediction of toxigenic fungal growth in buildings by using a novel modelling system. Department of Bioscience and Biotechnology and Department of Mechanical Engineering. University of Strathclyde Glasgow, Scotland.
48. Sánchez, A. Esqueda, M., Gaitán-Hernández, R., Córdova, A., y Coronado, M. (2008). Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología*, Volumen 28, pp. 17-24.
49. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología*, 16(2), pp. 14-46.
50. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013.
51. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2007). Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado.
52. Sohi, H., y Upadhyay R. (1989). Effect of temperature on mycelial growth of *Pleurotus* and their yield on selected substrates. *Mushroom Science* 12(2): 49-56.
53. Stamets, P. (1993). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Berkeley. 554 pp. <https://decroissons.files.wordpress.com/2014/04/paul-stamets-growing-gourmet-and-medicinal-mushrooms-2000.pdf>

54. STELLA[®], Systems Thinking for Education and Research. Recuperado el 9 de Noviembre del 2014. <http://www.iseesystems.com/software/Education/StellaSoftware.aspx>
55. Suárez, A.C. (2010). Obtención *in vitro* de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamiento de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
56. Sun, Pei-Ji y Jian-Jun Yu. (1989). The cultivation of *Pleurotus* mushrooms on sterilized substrate in the field. *Mushroom Science* 12(2):219-228.
57. Theradi, M. (1992). Cultivation of *Pleurotus* and *Volvariella* on coconut waste in India. *Mushroom research*, 27-31.
58. Upadhyay, R.C. y Vijay B. (1991). Cultivation of *Pleurotus* species during winter in India. *Mushroom Science XI, Proceedings of the 13th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*. A.A. Balkema, Netherlands.
59. Villaseñor-Ibarra, L., Arias-García A. y Soto-Velazco C. (1998). Cultivo de *Pleurotus* spp. sobre bagazo de maguey tequilero. *Bol. IBUG* 6: 195-202.