

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES

1.1 Importancia del cultivo de Hongo Ostra

Las especies del género *Pleurotus* (hongos ostra), cuya producción y consumo están en aumento en Tarija y pueden utilizar como sustrato para su cultivo, una variedad mayor de materiales que otros hongos (aproximadamente 200 desechos diferentes), debido a su rápido crecimiento micelial, a las demandas nutricionales simples necesarias para su desarrollo, que deben ser proporcionadas por el sustrato, y a su sistema de enzimas multilaterales, que le permiten biodegradar casi todos los tipos de residuos disponibles. Para darse una idea del aprovechamiento de dichos residuos, solo usando el 25% del volumen de las pajas de cereal que se queman en el mundo podrían producirse 317 millones de toneladas métricas (317 mil millones de kg) de hongos frescos por año (Nieto, 2010).

Siendo Tarija una zona mayoritariamente agrícola, en el cual se está implementando el aprovechamiento de los residuos de esta actividad, son variados los desechos que se emplean para el cultivo de los hongos. Es así como se puede usar para su producción directamente desde materiales de desechos lignocelulósicos (paja, aserrín, bagazo de caña, residuos de café, cáscara de semilla de arroz, de algodón, restos de poda, etc.) como sustrato para el cultivo de *Pleurotus*, puede producir toneladas de hongos frescos, mientras que los animales deben ser alimentados con grandes cantidades de forraje por largos periodos de tiempo.

La producción de hongos ostras se encuentra en una etapa de consolidación, con iniciativas que buscan diversificar la oferta alimentaria local. Los productores enfrentan el desafío de optimizar sus técnicas de cultivo para garantizar la calidad y competitividad de la cepa, lo que se refleja en el precio del producto. Actualmente, el costo de los hongos ostras se sitúa en 60 bolivianos por kilo, cifra que evidencia tanto la inversión en innovación en el proceso de cultivo como la demanda de un alimento nutritivo y accesible en el mercado regional.

1.2 Componentes nutritivos y funcionales del Hongo Ostra

El Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) contiene todos los aminoácidos esenciales, lo que lo hace poseedor de un valor nutritivo más alto que la proteína vegetal y muy cercana a la proteína animal. Contiene además carbohidratos; minerales como potasio, fósforo, hierro, zinc, cobre y magnesio; vitaminas como tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido pantoténico (B3), ácido ascórbico (C) y biotina (H); fibra cruda; ergosterol que es transformado en vitamina D por acción de los rayos UV al ser deshidratados al sol, importante en la absorción de calcio, sobre todo del fosfato de calcio, fundamental para el buen desarrollo de huesos y dientes (Ríos María del Pilar, 2010).

De la fracción lipídica también hacen parte los ácidos grasos, constituyentes que exhiben marcada acción biológica, hasta el punto de que son considerados como reguladores del metabolismo lipídico, reductores de la arterioesclerosis, así también como poseedores de actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana y anti convulsionante (Nieto, 2010).

1.3 Taxonomía del Hongo Ostra

Cuadro 1: Taxonomía de *Pleurotus ostreatus*

Reino:	Hongos - Fungi
Phylum:	Micophytae
División:	Micophyta (Hongos Verdaderos)
Clase:	Basidiomicetos - Basidiomicetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Pleurotaceae
Nombre científico:	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm
Nombre común:	<i>Hongo ostra</i>

Fuente: (Acosta, 2024).

1.4 Características fisiológicas

El hongo ostra es un hongo que degrada la materia orgánica y se alimenta principalmente de lignina y celulosa; estos componentes son azúcares complejos que se encuentran disponibles en la materia muerta, por ejemplo, cebada, caña, rastrojo de maíz, trigo, paja, etc. Además, en ambiente natural esta seta se alimenta de madera destruyendo la misma y de esta manera se desarrolla sobre tocones, arbustos, árboles, entre otras, también presentan diferentes formas de crecimiento, tales como; en grupo formando repisas laterales superpuestas al costado de los árboles y aislada, sobre la superficie horizontal del mismo (Aguinaga, 2012).

Pleurotus ostreatus, es un hongo destructor de la madera, está extendido en las zonas templadas y forma cuerpos fructíferos a temperaturas relativamente frescas comparados con otras especies de *Pleurotus*. Al igual que todos los hongos necesitan la fuente de carbono, ya que forma la base nutricional, puesto que, carecen de clorofila y por lo tanto no pueden realizar la fotosíntesis. Por esa razón los hongos pueden vivir y progresar sobre la materia orgánica muerta (Suárez, 2010).

1.5 Características morfológicas

El cuerpo de las setas se constituye principalmente de: sombrero (píleo), láminas (himenio) y pie reducido (estípite). Según (Santillán, 2018):

Sombrero: Señalan que tiene forma de paraguas, más o menos circular, su desarrollo se da en forma de una oreja u ostra. La carne blanca es de olor fuerte, tierno al principio y después blando (correoso), además es ovalado el sombrerillo de este cuerpo fructífero o seta, con la superficie lisa abombada y convexa. En dependencia de la edad es su tamaño, y aunque puede encontrarse ejemplares muy grandes, generalmente va desde 5 a 15 cm de diámetro, también presenta diferentes colores, como; blanco, grisáceo, pardo, crema etc.

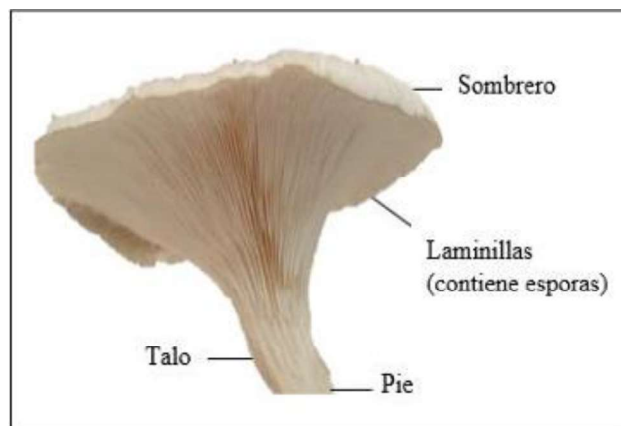
Láminas: En ellas se originan las esporas encargadas de la reproducción de la especie; son blancas o cremas, anchas, espaciadas unas de otras, a veces bifurcadas, y se

encuentran radialmente situadas como las varillas de una sombrilla, que van desde el pie o tallo que lo soporta, hasta el borde.

Pie: Es muy corto, levemente duro, algo lateral u oblicuo, con el principio de las laminillas en la parte de arriba. Además, es firme, blanco y algo peludo en la base.

Esporas: vistas al microscopio son cilíndricas de $8 - 11 \times 3 - 4 \mu\text{m}$, poseen color blanco a cremosa, además hialinas y lisas.

Imagen 1: Morfología de una seta

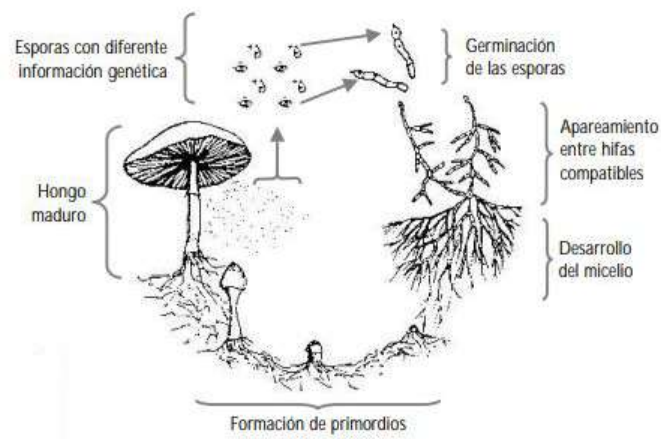


Fuente: (Santillán, 2018).

1.6 Ciclo reproductivo.

El ciclo reproductivo comienza cuando el hongo maduro suelta sus esporas, entre la semana 7 y 8. Las esporas son las células que darán origen al micelio, y este a su vez a la seta. Este ciclo finaliza cuando el hongo seta maduro, elimina o desprende las esporas y comienza a degradarse para morir. Las esporas son lanzadas por el himenio al exterior, si se depositan en lugares húmedos y de condiciones favorables, darán origen al micelio, éste crecerá bajo tierra o leños dando lugar a una seta con basidios en su himenio y se producirán las esporas para que sean nuevamente liberadas al exterior y se complete el ciclo de reproducción (Suárez, 2010).

Imagen 2: Ciclo de vida de un hongo



Fuente: (Gaitán-Hernández, 2006)

Después de la etapa de crecimiento, el hongo inicia su período reproductivo. La reproducción sexual de los hongos ocurre en tres etapas: Según (lifeder, 2023)

En la primera etapa, o plasmogamia del hongo *Pleurotus ostreatus*, ocurre la fusión de dos hifas somáticas compatibles, no diferenciadas, que unen sus citoplasmas e intercambian sus núcleos haploides (con un solo juego de cromosomas, simbolizados por n), ocurriendo la plasmogamia del tipo somatogamia.

Durante la cariogamia, los núcleos se fusionan y producen un cigoto, que es una célula diploide (con dos juegos de cromosomas en su núcleo, simbolizada por $2n$). Luego, el cigoto $2n$ experimenta la división celular tipo meiosis y produce 4 células haploides n , que son las esporas sexuales o basidiósporas; todo el proceso ocurre en los basidios, sobre las laminillas dentro del sombrero.

Cuando las basidiósporas caen sobre un medio favorable, como madera en descomposición o árboles muertos, germinan y producen las hifas que se desarrollan hasta formar el hongo de nuevo.

1.7 Elementos necesarios para el cultivo el hongo.

1.7.1 Medios de cultivo.

Para el desarrollo del micelio de los hongos en el laboratorio, se emplean medios de cultivo sólidos que le proporcionan al hongo los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Los medios de cultivo son generalmente vendidos por casas comerciales en diferentes presentaciones, como el caso del agar con extracto de malta y el agar con papa y dextrosa, sin embargo, es posible prepararlos.

A continuación, se mencionan algunos métodos sencillos de preparación de los más frecuentes medios de cultivo citados utilizados en preservación de cepas de *Pleurotus*.

EMA (Agar con extracto de malta)

Agar Extracto de Malta se utiliza para el aislamiento, cultivo y enumeración de levaduras y mohos en alimentos; es particularmente adecuado para levaduras y mohos, ya que contiene una alta concentración de maltosa y otros sacáridos como fuente de energía. La dextrina y la glicerina son las fuentes de carbono, y la peptona es una fuente de nitrógeno. El pH ácido del Agar Extracto de Malta es óptimo para el crecimiento de levaduras y mohos, mientras que restringe el crecimiento de otras bacterias.

El Agar de Extracto de Malta se ha utilizado durante años para cultivo de hongos y cultivo de levaduras en la industria azucarera, en la fabricación de jarabes, refrescos y otras bebidas (microkit, 2019).

- Composición del EMA:

- Extracto de Malta: 30 g/L.
- Agar: 15 g/L.
- Peptona: 3 g/L.
- pH final: $5,4 \pm 0,2$ tras ajustarlo con ácido láctico.

- Procedimiento del EMA:

Se pesan los ingredientes y se mezclan en el matraz con 1000 ml de agua destilada y la suspensión se calienta y agita hasta que queden totalmente disueltos los ingredientes. Disolver en 1 litro de agua destilada. Calentar agitando hasta ebullición. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos (o mejor aún, 116 °C, 15 minutos). Para un óptimo crecimiento fúngico, enfriar a 55°C tras autoclavar y acidificar con Ácido Láctico estéril al 10%, no recalentar el medio. Se puede añadir 1 ml/l de glicerol para evitar el desecamiento de placas con cultivos lentos (microkit, 2019).

PDA (Agar Dextrosa Papa)

El agar patata dextrosa es un medio de crecimiento basal microbiológico común elaborado a partir de infusión de papa y dextrosa utilizada para el crecimiento de los hongos. Es un medio de uso general para levaduras y mohos que se puede complementar con ácido o antibióticos como cloranfenicol, ácido tartárico y clortetraciclina como agentes selectivos y para inhibir el crecimiento bacteriano; el PDA también es útil para mantener cultivos madre de ciertos dermatofitos (Passen, 2021).

- Composición del PDA:

- Papa: 200 g/L.
- Dextrosa (Glucosa): 20 g/L.
- Agar: 15 g/L.
- Levadura: 2 g/L.
- Agua destilada 1000 ml.
- pH final 5,6 +/- 0,2 a 25°C.

- Procedimiento del PDA:

Pelar y poner a hervir la papa en 1000 ml de agua destilada o purificada durante 10-15 min; el extracto se filtra y se adiciona más agua hasta ajustar 1000 ml para reponer lo que se evaporó. Se agrega los otros ingredientes y se calienta a fuego lento moviendo constantemente durante 1-2 min hasta que queden totalmente disueltos.

Una vez diluido, el matraz se tapa con papel aluminio y se esteriliza a 15 lb de presión por 15 min en ollas de presión o autoclaves; en condiciones de asepsia (en cámara de flujo laminar o con ayuda de mecheros), el medio de cultivo tibio se vierte a cajas de Petri estériles de vidrio o desechables y se deja solidificar (Gaitán-Hernández, 2006).

SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)

Es un medio de cultivo utilizado en microbiología para el aislamiento y la cultivación de hongos, especialmente levaduras y mohos; fue desarrollado por el micólogo francés Raymond Sabouraud a finales del siglo XIX, y menudo se utiliza con antibióticos para aislar hongos patógenos de muestras con gran cantidad de otros hongos o bacterias. También se emplea para detectar contaminación microbiana en alimentos, cosméticos y muestras clínicas (Sagar, 2022).

Composición del SDA:

- Dextrosa (glucosa): 40 g/L.
- Peptona: 10 g/L.
- Agar: 15 g/L.
- Agua destilada: 1000 ml.
- pH final: Ajustado a aproximadamente 5.6 a 25°C.

Preparación del SDA:

- Combina todos los ingredientes en ~900 ml de agua deionizada.
- Ajusta el pH a 5.6 con ácido clorhídrico y completa el volumen final a 1 litro.
- Calienta hasta que hierva para disolver completamente el medio.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfía a ~45-50°C y vierte en placas Petri o tubos inclinados.

Principio del SDA:

La peptona proporciona la fuente de nitrógeno y vitaminas necesaria para el crecimiento de los organismos; la dextrosa se agrega como fuente de energía y carbono; el agar actúa como agente solidificante y puede contener antibióticos como

cloranfenicol o tetraciclina para inhibir el crecimiento bacteriano. El pH neutro de la modificación de Emmons parece mejorar el crecimiento de algunos hongos patógenos, como los dermatofitos (Sagar, 2022).

2.2.1. Obtención de micelio.

Al micelio de un hongo (forma algodonosa) que se desarrolla sobre un medio de cultivo nutritivo se le llama cepa. Su aislamiento se puede realizar por medio de tejido (fragmento del hongo) o por medio de esporas, requiriendo lo siguiente: bisturí o navaja, pinzas de disección, papel filtro o papel bond estéril, cámara de flujo laminar o mecheros, agujas de disección Alcohol o benzol como desinfectantes, pipetas, vasos de precipitado, cajas de Petri con medio de cultivo. Para certificar una siembra segura, debe el micelio presentar una textura densa de color blanco, fresco y sin contaminación. Además, es probable que exista exudantes de color amarillo, pero es mejor que el color sea uniforme (Villacís, 2017).

2.2.1.1. Aislamiento del micelio a partir de trozos de carpóforo.

Según (Gaitán-Hernández, 2006) este tipo de aislamiento es una de las formas más simples de obtener una cepa y el resultado es una copia idéntica del hongo del cual se ha obtenido el tejido.

En un ambiente de absoluta asepsia, incluyendo los materiales previamente esterilizados, se coloca el hongo, el cual deberá estar en buen estado y libre de tierra y/o insectos. El hongo se corta longitudinalmente con una navaja; con la ayuda de unas pinzas estériles y frías, se toman fragmentos del micelio o carne del hongo y se colocan en cajas de Petri con medio de cultivo. Las cajas con los aislamientos se incuban entre 25-28°C, de preferencia en la obscuridad o penumbra; 2 o 3 días después, se observará crecimiento micelial en forma algodonosa sobre la superficie del medio y el color será blanco o blanco amarillento, lo que indicará que el aislamiento se realizó correctamente; se deben seleccionar los cultivos con mejor apariencia y transferirse a nuevas cajas con medio de cultivo.

2.2.1.2. Aislamiento por medio de esporas.

Para llevar a cabo este aislamiento, se deberá contar con una esporada del hongo. La esporada se obtiene colocando el sombrero del hongo con las láminas hacia abajo sobre papel estéril por un tiempo de 6 a 8 hrs. Para evitar contaminación y favorecer un ambiente húmedo para que la descarga de esporas se realice adecuadamente, el hongo y el papel se tapan con un recipiente limpio y también estéril.

Transcurrido el tiempo, se retira el hongo del papel, quedando este impreso con las esporas en forma de una huella radial, de preferencia se seca en una incubadora durante 24 hrs. a 28-30°C., una vez obtenida la esporada sobre el papel, con una navaja o tijeras estériles se corta un 2 pequeño fragmento de aproximadamente 1 cm, que se sumerge en 100 ml de agua destilada estéril frío, agitándose para que las esporas se disuelvan en el líquido. De esta dilución, con ayuda de una pipeta, se toman 0.5 ml y se colocan en cajas de Petri con medio de cultivo. La caja se mueve ligeramente para distribuir homogéneamente el agua con las esporas en todo el medio. Las cajas se incuban en las mismas condiciones mencionadas para el aislamiento por tejido y 5 u 8 días después, se observará el desarrollo del micelio algodonoso, todo este proceso se debe realizar en condiciones de esterilidad absoluta.

Para evitar la contaminación por bacterias y hongos, a los medios de cultivo esterilizados para ambos tipos de aislamiento, antes de su solidificación, se les puede aplicar 100 mg/L de gentamicina, estreptomicina o penicilina y 100 ppm (0.1 por ciento) de benlate (benomyl) (Gaitán-Hernández, 2006).

1.7.2 Micelio o inóculo.

Según (Santillán, 2018), el micelio del hongo ostra que se cultiva y coloniza los granos de cereales, es considerado como el inóculo del hongo, mismo que posteriormente es aplicado en el sustrato, este inóculo también se conoce como primera generación, puesto que, el micelio provino de la cepa aislada en un medio de cultivo, por medio de esporas o por medio de hifas del hongo, posteriormente esta cepa se ha incubado en un periodo de 7 - 8 días y luego se ha inoculado en granos de cereales en el laboratorio.

La preparación de inóculo o semilla constituye la base para el cultivo comercial de las setas, y se refiere a la propagación o desarrollo masivo del hongo en granos de gramíneas, principalmente sorgo o trigo y para certificar una siembra segura, debe el micelio presentar una textura densa de color blanco, fresco y sin contaminación. Además, es probable que exista exudantes de color amarillo, pero es mejor que el color sea uniforme (Gaitán-Hernández, 2006).

La elaboración de inóculo se realiza en dos etapas:

Inóculo primario. - Es la propagación del micelio en semillas a partir de una cepa crecida en medio de cultivo.

Inóculo secundario. - Es la propagación del micelio en semillas a partir del inóculo primario, es decir, es la multiplicación del micelio para disponer de una mayor cantidad para su siembra en el substrato elegido para la producción de hongos.

La elección de los granos o semillas para la producción de inóculo dependerá de su disponibilidad, bajo costo y calidad; se pueden emplear semillas de sorgo, trigo, centeno, cebada, avena, mijo y arroz, entre otros.

La semilla previamente se limpia, lava e hidrata por inmersión en agua de 8-12 hrs. Transcurrido el tiempo de hidratación, los granos se enjuagan y se escurre el exceso de agua con la ayuda de un cernidor, pasando un lienzo seco sobre la semilla hasta que al momento de tomar una porción con la mano esta no quede húmeda. La cantidad de agua que absorbe la semilla es de aproximadamente 25-30 por ciento; una vez controlado el contenido de humedad en el grano, se coloca 300 g en bolsas de poli papel, después se esterilizan en olla de presión o autoclave, a 15 lb durante 50-60 min. Las bolsas esterilizadas se enfrían en una área aislada y limpia, de preferencia en una superficie desinfectada; las muestras así preparadas, servirán para hacer el inóculo primario y el secundario (Gaitán-Hernández, 2006).

El inóculo primario como se mencionó anteriormente, se elabora a partir del micelio desarrollado en medio de cultivo, este se corta con una navaja o bisturí flameado o desinfectado con alcohol, en fragmentos de aproximadamente 1 cm y con una aguja de

dissección se toma uno de éstos y se coloca sobre la semilla, se le deja un poco de aire a la bolsa y se le hace un pequeño nudo en la parte superior. Se incuba de 25-28°C en obscuridad hasta que el micelio cubra totalmente la semilla; 15 o 20 días después, el inóculo primario estará listo y podrá ser utilizado para elaborar el inóculo secundario (Gaitán-Hernández, 2006).

El inóculo secundario se realiza vaciando un poco de inóculo primario a nuevas bolsas con semilla estéril, se agita homogéneamente y se incuban en las mismas condiciones mencionadas para el inóculo primario. El inóculo secundario es el que se usa para la siembra y fructificación de las setas; si el inóculo no se emplea inmediatamente puede ser almacenado de preferencia en obscuridad y refrigeración a 5°C hasta por tres meses, aunque lo recomendable es utilizarlo a la semana de estar en refrigeración (Gaitán-Hernández, 2006).

1.7.2.1 Siembra o inoculación

Esta es una de las etapas más críticas del cultivo; el área de inoculación debe estar previamente desinfectada y no deben existir corrientes de aire, por lo que, las puertas y ventanas deben estar cerradas; se puede realizar en una cámara de flujo laminar o sobre una mesa desinfectada con alcohol, sobre esta mesa se coloca el sustrato previamente pasteurizado y enfriado con una temperatura menor a 30 °C, y se procede a colocar el micelio en el sustrato. Al finalizar la siembra se cierra por medio de un nudo, teniendo en cuenta de eliminar el aire del interior (Gaitán-Hernández, 2006).

Cuando la temperatura excede los 30 °C, el ritmo de crecimiento se vuelve lento llegando a la detención total y si la temperatura baja a 4 °C o menos el micelio sufre daños graves y puede incluso morir; se debe tener en cuenta que el personal este provisto de mandil limpio, mascarilla, cofia y guantes estériles si es posible (Santillán, 2018).

1.7.2.2 Tasa de inoculación.

El porcentaje de inoculación, puede variar del 2 al 5% del peso húmedo del sustrato. En la siembra comercial, es común, utilizar tasas de inoculación del 2 – 2,5%, lo que

es rentable. Además, la cantidad de micelio puede variar de 0,8 y 15% del peso húmedo del sustrato y no afectar el rendimiento del hongo, pero, el valor apropiado depende del sustrato utilizado y el inóculo. Sin embargo; hay que considerar que, a menor tasa de inoculación, el tiempo de colonización y el riesgo de contaminación aumentarán (Villacís, 2017).

1.7.3 Sustratos

El sustrato es la base de donde se realiza la siembra del hongo del género *Pleurotus*, toman los nutrientes necesarios para su alimentación de los materiales sobre los que crecen. 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). Para seleccionar el sustrato, es indispensable conocer la disponibilidad y abundancia del mismo en la región en donde se piensa cultivar el hongo seta; es importante tomar en cuenta, buen precio de adquisición y que sea fácil de transportar (Villacís, 2017).

(Aguinaga, 2012) señala que el hongo ostra debido a que posee enzimas lignocelulósicas, es uno de los organismos que disuelven la celulosa, la absorbe y la transforma en alimento para la humanidad, son hongos saprófitos, descomponedores primarios de materia orgánica como maderas, hojas secas y pajas. Los hongos requieren fuentes de carbono (celulosa 60 - 70%, hemicelulosa y 15% de lignina), nitrógeno y compuestos inorgánicos, como nutrientes. Por lo tanto, se clasifican en tres grupos los residuos que pueden ser empleados como sustratos para el cultivo de estos hongos: el primer grupo constituye las pajas de cereales (arroz, trigo, cebada, maíz, tallo de sorgo, entre otros), el segundo grupo corresponde a los tallos, hojas o resto de cultivo de plantas destinadas al uso industrial (algodón, girasol, tabaco, entre otros) y el último grupo pertenece a residuos derivados de algunas agroindustrias como las oleaginosas, destilerías, azucareras, aserraderos, entre otros.

Según (Gaitán-Hernández, 2006) algunos de los sustratos más utilizados para el cultivo de estos hongos son las pajas de cebada, trigo, centeno, avena, arroz y sorgo, y

en menor cantidad la pulpa de café y algunos bagazos como los de caña de azúcar y de maguey tequilero, entre otros. Algunas veces, es recomendable hacer una combinación de sustratos en diferente proporción, para incrementar la producción de hongos.

Según (Aguinaga, 2012), la acidez del sustrato también influye en el desarrollo del hongo. El potencial hidrogeno (pH) óptimo varía entre 6 y 8, y está en función de las especies de hongos, por lo que se recomienda realizar un pretratamiento a los sustratos con carbonato de calcio puro CaCO_3 , calcita (cal agrícola) o hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ del 1 - 2% para alcanzar este pH.

1.7.4 Tipos de sustratos

Los sustratos que se usen para realizar el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*, deben poseer características como son: buena disponibilidad en cantidad y continuidad, buen conocimiento de sus características físico-químicas, localización fácil y cercana, facilidad de transporte y manejo, además; de un precio ventajoso de adquisición.

Una de las cualidades del sustrato a considerar es la fácil obtención del mismo, que sea un desperdicio, autóctono de la zona en donde se va a realizar el cultivo, para que el costo y el traslado sea económico y factible; la disponibilidad del mismo debe ser continua y abundante para abastecer la producción del hongo (Garzón, 2008).

1.7.4.1 Bagazo de caña

El bagazo de caña de azúcar es un residuo que se obtiene en el proceso de la molienda de caña de azúcar, es leñoso, fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que se obtiene del proceso de molienda de la caña donde presenta baja densidad y en estado fresco un alto contenido de humedad (Villacís, 2017).

El bagazo de caña de azúcar contiene agua (49%), fibra (48%) y sólidos solubles (2,3%), la fibra consiste principalmente en celulosa (48%) y lignina (14,3%), además, su pH es de 6,1 y su nitrógeno total está en 1,23%, los sólidos solubles se refieren a los azúcares celulósicos, principalmente sacarosa que provee energía al hongo ostra (Aguinaga, 2012).

1.7.4.2 Paja de cereales

El tallo de cereales, estructuras que no son utilizadas en la industria alimentaria son denominados tamo. El tamo constituye un desperdicio que usualmente se utiliza como alimentación para equinos, posee un bajo valor comercial, tiene un alto contenido de carbohidratos y un bajo porcentaje de lignina, siendo su adquisición factible y agroeconómica (Garzón, 2008).

La paja de cereales contiene un 75% de carbohidratos, la mayor parte en forma de celulosa, el porcentaje de lignina es bajo; la paja de trigo contiene entre 28-42% de celulosa, 23-38% de hemicelulosa y de 12-21% de lignina; en este sustrato, la cal hidratada puede actuar como agente antibacteriano y matar todos los microorganismos competidores del cultivo del hongo ostra (Aguinaga, 2012).

1.7.4.3 Aserrín

El aserrín es otro de los residuos más accesibles y factibles contiene 54% de celulosa, 29% lignina, los carbohidratos totales son del 49% y el nitrógeno total es del 0,1%. La proporción C: N es de 492: 1, para realizar el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre aserrín, se debe utilizar aserrín de maderas duras como caoba o narra, ya que, para el aporte de un alto contenido de celulosa y lignina, porque de no ser así disminuye la cantidad de estos compuestos y por consiguiente el rendimiento de la producción. Es importante también considerar que previo a la utilización como sustrato del aserrín de las maderas duras, se debe dar algún tipo de tratamiento para eliminar compuestos fenólicos presentes en estas maderas (Garzón, 2008).

1.7.4.4 Suplementos

La fuente de nitrógeno empleada para los hongos ostras, es proporcionada en bajas cantidades por los sustratos, los cuales aportan con menos del 1% de N, debido a que, por su constitución misma, aportan mayores cantidades de carbono. Por lo tanto, para proporcionar el nitrógeno necesario para el cultivo, se adicionan suplementos tanto orgánicos (salvado de trigo, cereal, arroz, afrecho, entre otros), como inorgánicos (sales de ion amonio y sales de nitrato), (Santillán, 2018).

- **Afrecho de trigo:** es el residuo de la molienda del grano de trigo, compuesto por la cáscara (pericarpio) del grano, mezclado con parte superficial del albumen (endospermo), la composición química se detalla.
- **Trigo o Arroz integral:** es deseable que el *Pleurotus ostreatus* tome como fuente de carbono la lignina presente en la cascarilla de arroz, ya que a medida que pasaba el tiempo se agotaba la cantidad libre de glucosa disponible en el inóculo.

1.7.5 Nutrientes del sustrato.

Según (Santillán, 2018) estos requieren:

- **Carbono:** Es la fuente directa para el metabolismo de los hongos, útil para la formación de todas las partes y estructuras celulares. Además, este compuesto puede ser empleado de otras fuentes como polímeros, lípidos, carbohidratos, entre otros.

Según (Garzón, 2008) el hongo *P. ostreatus* requiere más de carbono que nitrógeno, esta relación varía de 30/1 a 300/1, es decir para esta especie resulta muy versátil, por lo tanto, se puede emplear para su cultivo casi cualquier residuo vegetal o mezclas. Pero la relación C/N adecuada del sustrato está en dependencia de la fase en la que se encuentre el hongo, por lo que bajas relaciones favorecen el desarrollo de cuerpo fructíferos y altas relaciones favorecen el crecimiento micelial.

- **Azúcares:** La glucosa, la galactosa y la manosa son buenos sustratos para los *Pleurotus*, a diferencia de la arabinosa y la xilosa producen un crecimiento no eficiente.
- **Lípidos:** Los aceites vegetales resultan favorables para el desarrollo micelial de *P. sapidus* y *P. ostreatus*.
- **Nitrógeno:** Los requerimientos de nitrógeno pueden ser aportados por las proteínas y aminoácidos que quedan de la desintegración químico-biológica de cuerpos orgánicos (estiércol, harinas, granos de cereales,). Por ello los *Pleurotus* tienen la habilidad de crecer sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno, como la urea, el nitrato de potasio, no obstante, para obtener un crecimiento adecuado dan preferencia a las fuentes orgánicas.

- **Minerales:** Los hongos ostra se desarrollan mejor cuando el sustrato contiene KH_2PO_4 .
- **Vitaminas:** Los *P. ostreatus* necesitan para su crecimiento tiamina en una concentración óptima de 100 mg/l e indican que no requiere de otras vitaminas cuando la mencionada vitamina está presente.

1.7.6 Tratamiento de los sustratos

Para utilizar los sustratos en el cultivo del hongo seta, es necesario someterlos a un tratamiento previo, que consiste básicamente en aplicarles calor para disminuir la flora microbiana nociva que está presente en ellos y de esta manera evitar que los microorganismos compitan por espacio y nutrientes con el micelio de *Pleurotus*.

Existen algunos sustratos a los que es recomendable aplicarles una fermentación aerobia, para proporcionarles una microflora capaz de proteger al micelio del hongo seta de otros microorganismos competidores; entre estos sustratos están la pulpa de café y los bagazos de maguey tequilero y de caña de azúcar, que deben ser utilizados preferentemente frescos, evitando aquellos que hayan tenido previamente un proceso fermentativo por almacenamiento (Gaitán-Hernández, 2006).

El tiempo de fermentación depende del sustrato, por ejemplo, para los bagazos se recomiendan de 8-10 días, mientras que la pulpa de café, de 3-5 días. Para realizar una fermentación homogénea, es necesario colocar el sustrato en forma piramidal, humedeciendo con agua y tapándolo con un plástico para mantener el calor y la humedad; dicho Sustrato debe voltearse cada 3 días para favorecer la aireación y el proceso de fermentación.

Los materiales que no requieren de fermentación, deberán mantenerse deshidratados y libres de plagas y enfermedades.

La Pasteurización es la técnica común de tratamiento del sustrato para el cultivo de *Pleurotus*, y su propósito es preparar a dicho sustrato para un eficaz desarrollo del hongo. Este método se puede aplicar de dos formas distintas:

a) Pasteurización con vapor. Consiste en colocar el sustrato en un área cerrada, esta puede ser un pequeño cuarto de concreto o un recipiente metálico, se le aplica vapor generado por una caldera eléctrica, de diésel o gasolina, por medio de tubos de cobre o mangueras resistentes al calor; se recomienda que la temperatura alcance entre de 70-80°C y que el sustrato se mantenga de 2 a 4 hrs. en esa condición.

b) Pasteurización por inmersión en agua caliente. El sustrato se sumerge en agua caliente (75-80°C) durante 1 hrs., una vez llevada a cabo una buena pasteurización del sustrato, este estará listo para ser sembrado con la semilla o inóculo previamente preparado.

Imagen 3: Olla de presión y autoclave para esterilización



Fuente: (Gaitán-Hernández, 2006)

1.7.7 Humectación del sustrato.

La humedad del sustrato debe mantenerse entre 60 y 75%, no es recomendable utilizar niveles mayores a los recomendados, ya que, afecta la disponibilidad del oxígeno en el sustrato, produciendo la aparición de organismos que se desarrollan en condiciones anaerobias y ocasionan pudrición del sustrato; si, por el contrario, el sustrato está muy seco, inhibe el crecimiento del micelio y disminuye la producción (Villacís, 2017).

Para determinar la humedad adecuada en la paja de cereales, se aplica la “prueba de la palma de la mano”, la cual consiste en tomar un puñado de sustrato y apretar fuertemente, si caen unas pocas gotas, la humedad es correcta (Aguinaga, 2012).

1.8 Fases y Factores necesarios para el Cultivo Del Hongo.

1.8.1 Incubación.

La incubación consiste en proporcionar al hongo las condiciones óptimas para que invada totalmente el sustrato en el menor tiempo posible (Aguinaga, 2012). El cuarto de incubación debe proporcionar al hongo según (Santillán, 2018):

- Temperatura: de 25 a 30 °C.
- Humedad: del 70 al 80%.
- Luminosidad: requieren oscuridad.
- Ventilación: No requiere ventilación, por lo que las concentraciones de CO₂ deben oscilar entre 20 000 y 30 000 ppm.

La incubación culmina entre los 25 y 30 días, cuando el hongo ha colonizado completamente el sustrato, donde se evidencia una coloración blanca sobre dicho sustrato y este está compacto.

Imagen 4: Condiciones de incubación del inóculo



Fuente: (Gaitán-Hernández, 2006)

Las fundas que ya están listas para la posterior etapa, presentan micelio de color blanco algodonoso, sin embargo, independientemente del porcentaje de colonización, otra característica que manifiestan los sustratos, es la acumulación de un líquido amarillo a rojizo entre el sustrato y la funda plástica (Villacís, 2017).

1.8.2 Inducción.

La inducción inicia al culminar la fase de incubación, trasladándose al área de fructificación, la cual consiste en la aparición de los cuerpos fructíferos, los cuales aparecen de 10 a 14 días para lo cual, se debe realizar perforaciones sobre la funda, o a su vez, colocar un tubo de PVC en la parte superior de la funda. (Santillán, 2018). En esta etapa se cambia bruscamente las condiciones de crecimiento del hongo:

- Temperatura: requiere de una disminución drástica de temperatura entre 10 a 15 °C, causándole un “shock térmico”.
- Humedad: debe oscilar entre 95 y 100%, para esto se debe aplicar un riego directo por aspersión y si existe un exceso de humedad se debe ventilar el lugar, o por el contrario, si la humedad es deficiente, se debe regar agua en el piso, paredes o colocar baldes con agua.
- Luminosidad: por lo general, una luz filtrada y tenue es la adecuada, con una intensidad entre 400 y 600 lux; estas condiciones se consideran estimulante en la formación de cuerpos fructíferos. Una baja iluminación, causa que el hongo adquiera un color blanco, el tallo se alargue y el rendimiento disminuya. La exposición directa es considerada dañina, pero una total ausencia de luz, causa malformaciones y coloraciones pálidos en el hongo. Se debe mantener ciclos de 12 horas de luz; un lapso menor a lo indicado, reducirá la eficiencia biológica a un 68% y hasta un 60% en el rendimiento.
- Aireación: para una adecuada formación de cuerpos fructíferos, el nivel de O₂ debe ser del 20% y un nivel de CO₂ por debajo de los 800 ppm, ya que, concentraciones superiores inhibe la formación de primordios.

1.8.3 Fructificación.

Según (Aguinaga, 2012), esta etapa comienza cuando se ha logrado observar los primeros cuerpos fructíferos, los cuales se desarrollan hasta alcanzar su madurez dentro de los 4 y 6 días.

- **Temperatura:** Una vez formado los primordios, la temperatura debe aumentarse de 18 a 24 °C., este factor controla la velocidad de desarrollo del cuerpo fructífero, lo que provoca un rápido crecimiento a mayores temperaturas y un desarrollo más lento a menores. El uso de temperaturas más bajas, induce al desarrollo de un tejido carnoso más firme y de mejor calidad, sin embargo, se obtiene hongos más oscuros.
- **Humedad:** Se debe disminuir hasta un 80 a 90%, si la humedad es baja, los sombreros se deshidratan y se parten, pero, si, por el contrario, la humedad es excesiva, pueden ser atacados por hongos y bacterias, los cuales causan reblandecimiento y amarillamiento. Para mantener la humedad, se debe regar pisos y paredes, pero nunca, directamente sobre la funda, ya que, esto podría causar contaminación o deformidad de los cuerpos fructíferos.
- **Iluminación:** Mantener fotoperiodos de 8 a 12 horas, de la misma manera que en el área de inducción; en la Aireación: debe existir mínimo un 60% de oxígeno, niveles inferiores inhiben el crecimiento de cuerpos fructíferos. Por otro lado, una ventilación excesiva, causará pérdida de humedad del sustrato y por ende disminución en el desarrollo del hongo.

Imagen 5: Producción de hongos ostras



Fuente: (Gaitán-Hernández, 2006)

1.8.4 Cosecha.

La cosecha se efectúa de forma manual, cuando los sombreros están totalmente extendidos sin el margen enrollado hacia arriba, con cuchillos bien afilados, se cortan

desde la base del pie para evitar remover el sustrato, aunque otros prefieren tomarlos con la mano y retirarlos directamente (Villacís, 2017).

Según (Gaitán-Hernández, 2006) los hongos se producen en oleadas, por lo que se deben cuidar para la próxima cosecha; la primera cosecha dura entre 1 y 3 días, luego del cual, los sustratos deben mantenerse nuevamente en las condiciones descritas en el proceso de inducción, produciendo la segunda oleada o cosecha al cabo de 7 a 14 días. Se pueden esperar de 2 a 4 cosechas, pero la producción de cada una es cada vez menor, las dos primeras son las más importantes, porque, corresponden al 90% de la producción.

- Temperatura: mantener entre 12 y 14 °C.
- Humedad relativa: mantener alrededor del 85%, para aumentar la calidad y la vida útil del producto, es recomendable reducir la humedad horas antes de la cosecha.

1.9 Condiciones del crecimiento

Estas son las condiciones óptimas en las distintas fases del cultivo del hongo ostra:

Cuadro 2: Condiciones de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*

Pasteurización	Temperatura	90 °C
	Duración	1/2-1 hora
Sustrato	Contenido de humedad	70-75%
	Temperatura	20-25 °C
Colonización	Temperatura ambiental	25-28 °C
	Humedad ambiental	70-80%
	Concentración de CO ₂	5000 ppm
	Duración	20-30 días
Inducción	Temperatura ambiental	10-27 °C
	Humedad ambiental	95-100%
	Luz	12 horas/día
	Concentración de CO ₂	400-800 ppm
	Duración	3-5 días
Producción	Temperatura ambiental	18-24 °C
	Humedad ambiental	85-90%
	Concentración de CO ₂	400-800 ppm
	Duración	3-5 días

Fuente: (Aguinaga, 2012).

1.10 Problemas del Cultivo.

El cultivo de hongo ostra tiene alta resistencia a enfermedades y plagas; la fase más delicada en el proceso productivo del hongo es la incubación, esto se debe a que el sustrato no es esterilizado correctamente, un excesivo porcentaje de humedad o la inoculación se hizo en un área contaminada (Cha, 2005)

1.10.1 Contaminantes.

El hongo ostra es poco susceptible a plagas y enfermedades; sin embargo, puede ser afectado por otros hongos (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Gliocladium*), principalmente en la etapa de incubación, debido a: una mala pasteurización del sustrato, falta de higiene en el momento de la siembra, condiciones ambientales inapropiadas (exceso de humedad y temperatura), instalaciones inadecuadas y falta de una correcta limpieza y desinfección dentro y fuera de las áreas de producción. (Gaitán-Hernández, 2006)

Imagen 6: Moho Verde en sustrato de residuos de algodón



Fuente: (Cha, 2005)

1.10.2 Plagas

Las principales plagas que atacan al hongo ostra son las moscas entre ellas se encuentran: *Sciáridos* (*Lycoriella auripila*), *Cécidos* (*Mycophila* sp.) entre otras; estas plagas en estado larvario se alimentan del micelio del hongo retrasando el crecimiento de los cuerpos fructíferos: perforan los tallos del hongo y los vuelven de color marrón.

La principal razón de que el sustrato se encuentre contaminado con este tipo de moscas es que no se realizó una adecuada desinfección del cuarto o espacio en donde se ejecutó la inoculación o el sustrato utilizado no fue correctamente utilizado (Villacís, 2017).

1.10.3 Enfermedades.

Las enfermedades que se manifiestan en las fructificaciones son causadas en gran medida por bacterias y virus; estos microorganismos se propagan rápidamente a través del agua, de insectos o utensilios sucios, por lo que su tratamiento y control es realmente difícil. Las enfermedades se favorecen con la humedad excesiva, el calor y una escasa ventilación, provocando que, en los píleos de los hongos, aparezcan zonas de color amarillo, anaranjado o café, que se pudren con rapidez y despiden un mal olor, afectando los rendimientos de producción. Una de las principales bacterias que causan estas manchas en las fructificaciones son las *Pseudomonas* (Gaitán-Hernández, 2006).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

2.1.1 Localización del ensayo

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la zona el Tejar Provincia Cercado departamento de Tarija, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho.

2.1.2 Ubicación del ensayo

Ubicado geográficamente entre los paralelos 21°31'17" de latitud sur y los meridianos 64°43'41" y 65° 05' de longitud Oeste, con una altura promedio de 1876 m.s.n.m.

2.2 CARACTERÍSTICA DEL ÁREA

2.2.1 Clima

La temperatura máxima media es de 26 °C, se da en los meses calurosos de octubre a marzo y la mínima media es de 9,4 °C, se da en los meses de invierno abril a septiembre que corresponden también a la época seca y la temperatura media anual es de 17,7 °C.

2.2.2 Humedad Relativa

La Humedad Relativa anual es de 58% en el ambiente, mientras que la precipitación media anual es de 596,4 mm presentando los meses de diciembre y enero los que tiene mayor precipitación.

2.3 MATERIALES

2.3.1 Material vegetal

Para el presente trabajo se utilizó material vegetal en este caso el fruto o seta del hongo ostra (*Pleorotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm) se compró la seta fresca de una eco tienda (Setas Tarija) y se trabajó a partir de ella.

2.3.2 Material de laboratorio

2.3.2.1 Área de preparación

- Balanza de precisión.
- Pipetas.
- Agua destilada.
- Frascos y tubos de ensayo.
- Cajas Petri

2.3.2.2 Área de esterilización

- Autoclave.
- Estufa de esterilización.

2.3.2.3 Área de siembra

- Cámara de flujo laminar.
- Mechero.
- Alcohol.
- Bisturí.

2.3.2.4 Componentes orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo y otros.

- PDA (Potato Dextrosa Agar).
- AN (Agar Nutriente).
- Peptixan.
- Extracto de malta.
- Agar.
- Dextrosa (glucosa).
- Soluciones desinfectantes (alcohol, hipoclorito de sodio, agua oxigenada).

2.3.3 Material y equipo de la cámara de crecimiento.

- Termómetros de máximas y mínimas.
- PH-metro
- Iluminación fluorescente.

- Calefacción y refrigeración
- Gradillas para tubos de ensayo.

2.3.4 Material equipo Digital.

- ImageJ (Aplicación para la medición)

2.4 METODOLOGÍA

La metodología que se usó para este trabajo es la investigación experimental, descriptiva y explicativa, se usó el método de cultivo in vitro en su fase de establecimiento, se comenzará con la preparación de los diferentes medios de cultivo y se utilizarán los diferentes métodos de aislamiento y desinfección.

2.4.1 Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar (en la fase de establecimiento) de acuerdo al siguiente orden: se llevó un arreglo de (3 x 2), 6 tratamientos, se usó tres tipos de medios de cultivo y con dos tipos de aislamiento; se realizó 10 repeticiones por tratamiento (60 muestras analizadas), de manera que se podrán comparar las diferencias entre tratamientos y tipos de aislamiento mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Diseño:	Completamente al azar.
Factor A:	2 tipos de aislamiento A1 y A2
Factor B:	3 medios de cultivo M1, M2 y M3
N.º de tratamientos:	6
N.º de repeticiones:	5
Unidades experimentales:	30 cajas Petri
Cada unidad experimental:	5 cajas Petri

2.4.2 Diseño experimental en el laboratorio

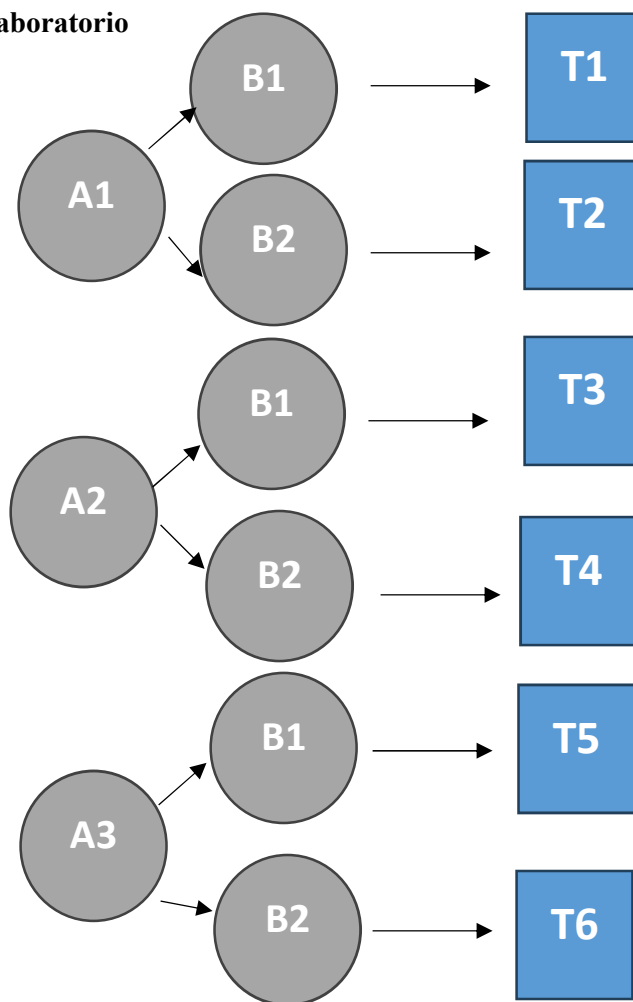
Factor A₁: PDA

Factor A₂: EMA

Factor A₃: AN

Factor B₁: Aislamiento 1

Factor B₂: Aislamiento 2



2.4.3 Diseño completamente al azar

Tratamientos/Repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5
T1					
T2					
T3					
T4					
T5					
T6					

2.5 PROCEDIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y cultivo in vitro de la facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, el procedimiento es el siguiente:

2.5.1 Descripción de procedimiento

Después de haber realizado nuestro diseño experimental toca describir las metodologías a usar para la toma de datos para posteriormente estudiarlas en detalle para que puedan ser reproducidas fácilmente. Se incluyeron dos metodologías de aislamiento la primera a partir del cuerpo del hongo y la segunda metodología de aislamiento a partir se somete al hongo a una cámara húmeda para la aparición del micelio.

2.5.2 Identificación del Hongo Ostra

El ejemplar del hongo ostra se obtuvo mediante compra a una tienda orgánica "Mi Setas Tarija" para su posterior identificación del hongo ostra que se llevará a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho.

2.5.3 Obtención de Micelio o cepa:

Con el fin de saber cuál es el método más efectivo para obtener mayor cantidad y calidad de material biológico para el trabajo, se realizó dos tipos de aislamiento para la obtención del micelio y posteriormente fueron sembrados en los tres medios en cajas Petri para su posterior estudio y comparación entre los tratamientos.

2.5.4 Establecimiento in vitro

Preparación del medio de cultivo

Se utilizó los siguientes medios y se describió su procedimiento a realizar:

M1 = Papa Dextrosa Agar (PDA)

Para la preparación del medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar) primero, se midió un volumen total de 0,3 litros, suficiente para la elaboración de 20 cajas Petri. Luego, se calculó la cantidad de PDA requerida según su concentración estándar (39 g/L), obteniendo un total de 11,7 g para la preparación; una vez preparados los ingredientes, se ajustó el volumen a 300 ml, asegurando una distribución homogénea del medio, se verifica el pH, el cual debe mantenerse en 5,6 para proporcionar un entorno favorable para el desarrollo de microorganismos; la receta completa y más detallada se puede revisar en el **Anexo 1**.

El siguiente paso es el autoclavado, un proceso esencial de esterilización donde el medio se somete a 121°C durante 20 minutos. Antes de que el agar se solidifique, el medio se dispensa en cajas Petri estériles bajo condiciones de asepsia, asegurando una manipulación cuidadosa para evitar contaminaciones; cada caja Petri recibe 15 ml del medio de cultivo, garantizando una distribución uniforme y finalmente, las cajas Petri son selladas y almacenadas en refrigeración hasta su uso, conservando sus propiedades.

Imagen 7: Bote de PDA (Potato Dextrosa Agar)



M2 = Agar Extracto de Malta (EMAXAN)

Para con la preparación del medio EMAXAN, se midió un volumen de 0,21 litros, asegurando una cantidad precisa para la elaboración de las placas; este medio ha sido propuesto por Labofito, y se dispone para su uso en 14 cajas Petri; los ingredientes más detallados se pueden revisar en el **Anexo 2**.

Para la formulación, se incorporaron los siguientes componentes en proporciones específicas: dextrosa (30 g/L, equivalente a 6,3 g), peptixan (10 g/L, equivalente a 2,1 g), extracto de malta nacional (30 g/L, equivalente a 0,2 g) y agar (15 g/L, equivalente a 3,15 g); estos ingredientes son esenciales para garantizar el crecimiento adecuado del cultivo.

Una vez preparada la mezcla, se ajustó el volumen final a 210 ml, asegurando una distribución homogénea del medio. Posteriormente, se verificó el pH, que debe mantenerse en 5,4, ya que este factor es determinante para el desarrollo óptimo del cultivo; por último, se realiza lo recomendado anteriormente en el primer medio.

Imagen 8: Materiales para la preparación de Emaxan



Fuente: 1) Agar, 2) dextrosa, 3) peptixan.

M3 = Agar Nutriente (AN)

El procedimiento para la preparación y dispensación de Agar Nutriente en cajas Petri, primero, se comenzó con la preparación del medio, seleccionando agar nutritivo como sustrato base. Se mide un volumen total de 0,21 litros, suficiente para la elaboración de 14 cajas Petri. Luego, se calcula la cantidad de agar nutritivo requerida según su concentración estándar (28 g/L), obteniendo un total de 5,88 g para la preparación; la receta completa se puede revisar en el **Anexo 3**.

Una vez preparado el medio, se ajustó el pH a 7,4, asegurando un entorno favorable para el desarrollo de microorganismos. Posteriormente, se procedió con el autoclavado, donde la mezcla es sometida a 121°C durante 20 minutos; este proceso es fundamental para la esterilización del medio, eliminando cualquier microorganismo no deseado.

Finalmente, las placas Petri fueron selladas correctamente y almacenadas en refrigeración hasta su uso, garantizando que el medio conserve sus propiedades y se mantenga apto para aplicaciones microbiológicas.

Imagen 9: Bote de AN (Agar Nutriente)



Se sembraron *Pleurotus* en los 3 medios de cultivos, con el fin de compararlos, las cajas se cubrieron con papel aislante de plástico y se incubaron a 25°C., el tiempo para la colonización completa será de a partir de la inoculación, durante los cuales se tomarán muestras diarias del crecimiento radial del hongo.

La unidad experimental fue la caja de Petri, se usó un diseño Factorial (2x3), donde el factor aislamiento se presentó con dos niveles (Aislamiento de micelio a partir de cultivo en trigo del hongo en frasco y Aislamiento del micelio a partir de trozo del hongo con desinfección) y el factor tipo de medio de cultivo son tres (PDA, EMA y AN).

2.5.5 Tipos de aislamientos empleados

A1: Aislamiento de micelio a partir de cultivo en trigo del hongo en frasco.

Se tomó el hongo maduro sin esporular para aislar el micelio a partir de un cultivo en trigo, se selecciona un frasco asegurando condiciones de asepsia. Se incubó el hongo durante unas semanas en las condiciones necesarias para su cultivo hasta notar la presencia de micelio. Con herramientas estériles, se extrajo una porción del micelio vigoroso y se transfiere a placas Petri con medio de cultivo. Luego, se incubó bajo condiciones controladas hasta observar un crecimiento uniforme, descartando posibles contaminaciones. Finalmente, se seleccionan las mejores muestras para su conservación y para realizar un correcto aislamiento, garantizando una cepa de calidad para producción extensiva; se puede revisar a partir del **Anexo 15**.

A2: Aislamiento del micelio a partir de trozo del hongo con desinfección.

Este aislamiento fue a partir de una parte o trozo del hongo, el cuerpo fructífero del hongo es fuente de una amplia contaminación por bacterias, levaduras y mohos, se planteó una metodología que empleara la desinfección del trozo del hongo sin que fuera letal para las hifas, los trozos debían tener una menor área para que la exposición a los desinfectantes fuera mayor. Se tomó el sombrero y se cortó con un bisturí estéril y en un ambiente estéril, pequeños cuadrados de 15 mm de lado. Se desinfectó con agua oxigenada sumergiendo los trozos del hongo por unos segundos y luego se inoculó las cajas Petri, se puede revisar a partir del **Anexo 19**.

2.6 Variables a evaluar

2.6.1 Presencia de contaminantes:

Determinación de la pureza del cultivo mediante técnicas microbiológicas para identificar la presencia de contaminantes, se observará en los distintos medios de cultivos que uso para detectar contaminaciones bacterianas o fúngicas.

2.6.2 Descripción de la morfología del Micelio:

Observación y descripción de las características morfológicas del micelio en los distintos medios de cultivo; se observará color, textura, formación de rizomorfos.

2.6.3 Tasa de Crecimiento Micelial:

Medición del crecimiento del micelio en términos de diámetro o área cubierta en un período de tiempo de 10 días que se evaluó.

Para una medición más precisa y más eficiente se usó un programa especializado (ImageJ) para la medición del área cubierta del hongo tomando fotos del micelio en las cajas Petri y subiendo al programa, una breve descripción de ImageJ; es un programa que mide los pixeles de la foto y sabiendo una distancia en la vida real se puede saber cuánto mide cualquier distancia en la foto, poniendo en la escala se puede sacar de forma precisa el área del crecimiento del hongo. Revisar **Anexo 22**.

2.6.4 Tiempo de Colonización Completa:

Medición del tiempo requerido para que el micelio colonice completamente el medio de cultivo; se medirá los días necesarios para cubrir toda la superficie del medio de cultivo en los distintos tratamientos.

2.6.5 Identificación microscópica:

Se identificará el micelio a través del microscopio con un montaje con la técnica de la cinta adhesiva, con tñido de azul de tripano para determinar las hifas y esporas.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de colonias formadas de micelio de *Pleurotus ostreatus* y porcentaje de contaminación

Se realizó la observación de las cajas Petri durante 10 días de incubación donde se pudo apreciar las cajas que se iban colonizando con el hongo *Pleurotus ostreatus* a medidas del paso de los días, así como también se pudo observar el crecimiento de contaminaciones de bacterias y otros hongos, que impidió y freno el crecimiento de nuestro hongo; como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1: Porcentaje de colonias formadas de micelio y contaminación

Pureza del Cultivo			
Medio de Cultivo	Aislamiento	Cajas colonizadas con micelio (%)	Presencia de contaminaciones Bacterianas o Fúngicas (%)
PDA	1	90.00	10.00
	2	20.00	80.00
EMA	1	50.00	50.00
	2	10.00	90.00
AN	1	20.00	80.00
	2	0.00	100.0

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 1** se aprecia que el mayor desarrollo de los hongos de *Pleurotus ostreatus* se presentó en el medio de cultivo de PDA con un 90 % en relación a los demás medios. Sin embargo, en el medio AN no logró desarrollar buenos porcentajes de colonización de los micelios; con respecto a la contaminación se presentó en mayor proporción en los medios EMA y AN., la contaminación que se presentó no está directamente relacionada con el medio empleado, probablemente se deba durante el manipuleo de la siembra.

Sin embargo, se pudo observar que presencias bacterianas mínimas no impiden que siga creciendo el micelio del hongo, esto nos pasó en más que todo en el medio PDA donde se detuvo el crecimiento de la bacteria y pudo colonizar la caja Petri nuestro hongo *Pleorotus ostreatus*.

Discusión

Los resultados evidencian que el medio PDA favorece de manera significativa la colonización del micelio, alcanzando un 90% en uno de los aislamientos (A1), lo que sugiere que la composición nutrimental y las condiciones que ofrece este medio (por ejemplo, una fuente rica en carbohidratos provenientes de la papa y la dextrosa) son ideales para el desarrollo de este hongo. En contraste, el medio AN solo logró porcentajes muy bajos de colonización (de 20% a incluso 0%) acompañado de niveles muy altos de contaminación (80–100%), lo que pone de manifiesto que en dichas condiciones el ambiente no es apto ni para el crecimiento óptimo del hongo ni para mantener la pureza del cultivo.

Un aspecto notable es la marcada diferencias entre los distintos aislamientos en el mismo medio como se pudo observar en PDA se observó que en el aislamiento (A1) alcanzó un excelente desarrollo del micelio (90% de colonización con solo un 10% de contaminación), el segundo aislamiento (A2) mostró resultados opuestos (20% de colonización y 80% de contaminación). Esto indica que, además del medio de cultivo, el factor humano o metodológico (como la técnica de inoculación, condiciones de esterilidad o manipulación durante la siembra) juega un rol crucial en el éxito final del cultivo; la diferencia entre réplicas sugiere la necesidad de estandarizar las prácticas y revisar minuciosamente los protocolos de manipulación para conseguir condiciones reproducibles y controladas.

3.2 Descripción morfológica en los medios de cultivo

Para la toma de datos de la morfología del micelio se lo realizó mediante el transcurso de los días de incubación (15 días) y una vez finalizado se contabilizó los siguientes datos, describiendo el color, textura, densidad del micelio del hongo *Pleorotus ostreatus* y según el tipo de aislamiento la presencia de exudación en la caja Petri.

Tabla 2: Descripción morfológica del hongo *P. ostreatus* en los distintos tratamientos

Morfología del Micelio		Descripción			
Medio de Cultivo	Aislamiento	Color	Textura	Densidad	Exudado
PDA	1	Blanco	Algodonoso Distribución Uniforme	Alta	Ámbar
	2	Blanco	Algodonoso Distribución Uniforme	Media	Café
EMA	1	Blanco, amarillo, naranja	Algodonoso Distribución Uniforme	Media	Ámbar a café
	2	Blanco, amarillo, naranja	Algodonoso y desigual	Media	Café
AN	1	Blanco a gris	Algodonoso semiuniforme	Baja	Ausente
	2	Blanco a gris	Algodonoso semiuniforme	Baja	Ausente

Fuente: Elaboración propia.

Las cajas Petri con medio PDA presentaron un desarrollo parejo y blanquecino, no presenta pigmentos de otros colores, más que el exudado producido por el grano de trigo usado en el aislamiento 1 que provoca un color de ámbar a café al reverso de la caja. En el medio EMA se presentan pigmentos en el reverso de las cajas de color amarillento, naranjado a café, desarrollo parejo y medio denso y blanquecino; el medio de cultivo AN presenta desarrollo desigual, con densidad baja y lenta.

En la caja Petri se puede observar el crecimiento del micelio donde las hifas forman circunferencias, esto se debe a que el micelio crece uniformemente desde el punto de inoculación hacia todas las direcciones; como las hifas avanzan con la misma velocidad en el medio homogéneo, el frente de crecimiento se ve como un círculo perfecto y el crecimiento no es totalmente continuo: puede presentar pulsos o fases según

disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad; cada pulso genera un anillo visible: zonas más densas alternadas con zonas menos densas. Temperatura, humedad y luz pueden influir en la periodicidad de los anillos.

Discusión

- **Medio PDA:** En las cajas Petri con PDA se observa un desarrollo homogéneo del micelio, presentando un color blanco, textura algodonosa y una distribución uniforme. El aislamiento 1 se caracteriza por una **alta densidad** y la presencia de exudado de tonalidad ámbar, atribuible al grano de trigo empleado en la siembra, mientras que el aislamiento 2 presenta densidad media y un exudado de tono café; esta uniformidad en el desarrollo indica que el medio PDA proporciona los nutrientes y condiciones físicas idóneas para el crecimiento vigoroso del micelio.
- **Medio EMAXAN:** En este medio, el micelio se presenta con variaciones en el color (blanco, amarillo, naranja), y si bien la textura es algodonosa, se evidencia una distribución algo desigual en al menos uno de los aislamientos. La densidad es de nivel medio y el exudado varía entre tonalidades de ámbar a café, donde la presencia de variados pigmentos sugiere cambios en la actividad metabólica o posibles respuestas al estrés, lo que puede influir en la producción de compuestos secundarios.
- **Medio AN:** Este medio muestra un crecimiento poco uniforme; el micelio adquiere tonalidades que varían de blanco a gris y presenta una textura "algodonosa semiuniforme" con **densidad baja**. La ausencia de exudado en ambos aislamientos confirma que las condiciones nutricionales y físicas ofrecidas por AN son subóptimas para estimular una colonización vigorosa y un desarrollo metabólico activo.

3.3 Tasa de crecimiento micelial

3.3.1 Comparación de crecimiento micelial por día

Día 0

El estudio del crecimiento micelial comenzó el 20 de noviembre de 2024, marcando el inicio del proceso de siembra o inoculación de los diferentes tratamientos en los respectivos medios de cultivo; durante esta fase inicial, se llevó a cabo una evaluación detallada de las áreas ocupadas por el hongo en cada condición experimental, con el objetivo de cuantificar la extensión inicial de la colonización micelial.

Tabla 3: Tasa de crecimiento del Día 0

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	73,099	80,523	73,229	59,161	65,208	69,851
EMA	T2	98,388	73,108	80,234	90,715	80,981	84,230
AN	T3	57,732	57,865	67,851	67,832	69,437	63,927

Fuente: Elaboración propia.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento micelial (expresada en $\text{mm}^2/\text{día}$), se midieron las superficies de desarrollo en cada unidad experimental; se calculó una media por tratamiento con el fin de determinar el área promedio inicial de siembra, lo que permitirá una comparación más precisa de la dinámica de crecimiento en días posteriores, podemos observar en imágenes en el **Anexo 25, 26 y 27**.

En la **Tabla 3** se puede observar todos los tratamientos iniciaran con una media similar siendo la mayor media fue en el medio EMA presentando una ligera ventaja sobre los otros medios. Todos estos datos que proporcionan una base fundamental para el análisis de la eficiencia de cada medio de cultivo en la promoción del desarrollo micelial y facilitarán la interpretación de los factores que influyen en la expansión del hongo bajo condiciones controladas.

Día 2

El 22 de noviembre de 2024, se registraron las mediciones correspondientes al segundo día de desarrollo micelial, permitiendo evaluar la tasa de expansión en función de los medios de cultivo empleados; se observó una tendencia general de incremento en la superficie colonizada, lo que indica una progresión favorable del crecimiento del hongo en todos los tratamientos. Revisar registros fotográficos en el **Anexo 28,29 y 30**.

Tabla 4: Tasa de crecimiento del Día 2

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	112,306	107,466	106,457	106,581	114,271	109,369
EMA	T2	112,523	110,853	122,569	121,776	118,195	117,086
AN	T3	94,155	101,217	89,124	99,867	91,398	95,036

Fuente: Elaboración propia.

Los datos de la **Tabla 4** reflejan que el medio PDA obtuvo un aumento sustancial en su tasa de crecimiento; se alcanzó una media de 109,369 mm²/día., lo que demuestra una intensificación en la colonización micelial respecto al día 0.

Para el medio EMA, se observaron crecimientos relativamente homogéneos, los registros oscilaron entre 344,248 mm²/día y 397,338 mm²/día, reflejando un notable incremento en comparación con la medición inicial.

En el medio AN, los aislamientos evidenciaron un crecimiento moderado en comparación con PDA y EMA, lo que indica una expansión estable, aunque menos acelerada en relación con los demás medios.

Día 3

El 23 de noviembre de 2024, se continuó con la evaluación del desarrollo micelial en los distintos medios de cultivo, observándose una progresión sostenida en la tasa de crecimiento; a partir de los valores promedio obtenidos, se puede establecer un comportamiento diferencial entre los tratamientos evaluados.

Tabla 5: Tasa de crecimiento del Día 3

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	145,058	138,238	137,731	135,551	138,294	138,938
EMA	T2	197,330	193,092	199,740	192,048	202,286	196,861
AN	T3	282,980	265,052	251,799	226,824	235,980	251,733

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 5** se puede observar que el medio PDA, el primer aislamiento presentó una media de 138,938 mm²/día, lo que confirma una progresión estable desde las mediciones previas. Para EMA, el crecimiento también fue significativo se registró un valor de 196,861 mm²/día, aunque algunas repeticiones quedaron sin datos debido a problemas de contaminación, como también paso en AN que solo una muestra quedó libre de contaminaciones y se notó un crecimiento para seguir tomando datos.

Estos resultados reflejan la importancia de mantener condiciones óptimas de asepsia durante el desarrollo experimental, ya que la presencia de contaminación en ciertas muestras afectó la recopilación de datos en EMA y AN. A pesar de estos inconvenientes, la tendencia observada hasta el día 3 confirma una colonización micelial sostenida, con diferencias marcadas según el medio de cultivo y el aislamiento empleado.

Día 5

El 25 de noviembre de 2024 se realizó la medición, pasaron dos días de la última, se observará un mayor crecimiento debido al día que no se midió; se puede observar el registro fotográfico en el **Anexo 31, 32 y 33**.

Tabla 6: Tasa de crecimiento del Día 5

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	575,520	577,282	613,433	592,321	559,487	583,328
EMA	T2	823,233	841,928	812,740	815,012	819,840	822,486
AN	T3	763,521	743,469	735,202	765,442	771,184	755,635

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 6** se puede observar que el medio EMA muestra la mayor media al día 5 con una media 822,551 mm²/día., aproximadamente un 41% más alta que PDA y un 9% más alta que AN, indicando que en este punto del crecimiento EMA favoreció la expansión micelial en mayor medida.

En AN tiene rendimiento intermedio con una media 755,764 mm²/día, claramente superior a PDA en magnitud absoluta pero inferior a EMA.

En el PDA presenta la media más baja del día 5, aunque las repeticiones muestran variabilidad y al menos una repetición (R3) con un valor notablemente mayor que las demás, lo que sugiere heterogeneidad entre placas.

Día 6

El 26 de noviembre de 2024 se realizó la medición donde se notaron mayor crecimiento en poco tiempo, como se verá a continuación y se puede revisar el registro fotográfico en el **Anexo 34, 35 y 36**.

Tabla 7: Tasa de crecimiento del Día 6

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	1.544,042	1.523,028	1.520,762	1.522,195	1.532,833	1.528,547
EMA	T2	1.791,596	1.752,534	1.788,685	1.753,406	1.735,906	1.764,289
AN	T3	1.305,538	1.386,783	1.211,433	1.407,466	1.390,494	1.338,261

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 7** se puede observar que el PDA mostró un salto muy grande entre los días 5 y 6, lo que indica que el micelio en ese medio entró en una fase de expansión muy acelerada justo después del día 5. La magnitud del incremento sugiere que PDA permitió una respuesta rápida del micelio en ese intervalo, posiblemente por agotamiento del período de latencia y acceso a recursos que favorecen la extensiva ramificación y colonización.

EMA mostró el mayor valor absoluto en este día y un aumento absoluto casi igual al de PDA. Sin embargo, en términos relativos su crecimiento fue menor que el de PDA porque partía de un nivel ya elevado; esto indica que EMA mantiene una alta capacidad de soporte de crecimiento continuo y ya estaba en una fase de crecimiento vigoroso el Día 5, continuando con una fuerte expansión en el Día 6.

AN también presenta un incremento claro, pero tanto el aumento absoluto como el relativo son menores que en PDA y EMA; esto sugiere que en AN la transición a la fase de máxima expansión fue más moderada: el micelio crece de forma sostenida, pero con menor potencia en ese intervalo.

Día 7

El 27 de noviembre de 2024 se realizó la medición correspondiente ya se puede observar a simple vista el crecimiento más rápido que se va teniendo en todos los tratamientos. Revisar registros fotográficos en el **Anexo 37, 38 y 39**.

Tabla 8: Tasa de crecimiento del Día 7

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	3.595,554	3.537,772	3.531,688	3.469,429	3.473,209	3.521,222
EMA	T2	3.192,509	3.188,785	3.158,139	3.219,727	3.172,376	3.186,240
AN	T3	1.729,529	1.779,534	1.702,489	1.706,2	1.693,733	1.722,022

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 8** se puede observar que el PDA mostró una respuesta tardía pero explosiva; entró en fase de expansión muy acelerada justo después del Día 5 y continuó con elevada pendiente hasta Día 7, superando a EMA en el Día 7 en valor absoluto. Esto sugiere que PDA favorece un pico de crecimiento rápido una vez superada la fase de latencia; puede ser ventajoso cuando se busca una colonización rápida a partir de un estado inicial moderado.

EMA mantuvo el mayor valor absoluto en Día 6 y creció de forma sostenida hasta el Día 7; su aumento absoluto entre 6 y 7 es grande, aunque menor en porcentaje que PDA porque partía de un nivel mayor. EMA demuestra alta capacidad para soportar crecimiento continuo desde fases tempranas y entrega altos valores acumulados, con menor “explosión” relativa que PDA, pero con consistencia.

AN mostró una subida los primeros días, pero la pendiente se aplanó entre Día 6 y 7. El micelio en AN crece de forma sostenida, pero con menor empuje en la ventana crítica que se demostraron en este día siendo el medio que tiene el menor crecimiento.

Día 8

El 28 de noviembre de 2024 se tomaron las mediciones diarias del crecimiento micelial en los tres medios ensayados; se observó una tendencia general de incremento en la superficie colonizada, como se mostrará en la siguiente tabla. Revisar registros fotográficos en el **Anexo 40, 41 y 42**.

Tabla 9: Tasa de crecimiento del Día 8

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	4.782,803	4.844,642	4.756,684	4.833,206	4.808,947	4.805,148
EMA	T2	4.505,030	4.421,710	4.483,106	4.484,033	4.537,178	4.486,052
AN	T3	2.243,391	2.153,778	2.133,745	2.135,069	1.933,334	2.117,354

Fuente: Elaboración propia.

En el **Tabla 8** se puede observar en el medio PDA se experimentó una fase de latencia relativa seguida de una expansión explosiva entre los días 5–7 que continúa, pero con menor pendiente entre 7→8. El comportamiento sugiere que PDA permite una respuesta muy rápida del micelio una vez superada la fase inicial y que, a partir de Día 7, la velocidad de crecimiento comienza a estabilizarse en valores altos y ya compite de igual a igual con EMA en área total.

EMA presenta una trayectoria más constante y temprana que PDA: ya desde Día 5 mostraba valores elevados y mantiene crecimiento sostenido sin picos extremos. Entre días 7 y 8 EMA sigue aumentando a buen ritmo, aunque PDA lo alcanza y lo supera ligeramente en algunos días previos. EMA es el medio más estable y predecible para obtener áreas grandes desde fases tempranas; sigue siendo una de las mejores opciones para crecimiento continuo y acumulado.

AN mantiene un patrón de crecimiento sostenido, pero más lento y con menor acumulado que los otros dos medios. No muestra la explosión observada en PDA ni la consistencia temprana de EMA, lo que sugiere límites en la capacidad de soporte de este medio para expansión rápida del micelio.

Día 9

El 29 de noviembre de 2024 se registraron las mediciones diarias; en general las tres condiciones continuaron su tendencia de crecimiento con incrementos respecto al octavo día, aunque con diferentes magnitudes relativas y absolutas. Revisar registros fotográficos en el **Anexo 43, 44 y 45**.

Tabla 10: Tasa de crecimiento del Día 9

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	5.245,299	5.236,768	5.238,240	5.328,292	5.281,175	5.265,838
EMA	T2	4.975,159	5.025,574	5.092,309	5.277,741	4.965,976	5.066,080
AN	T3	2.820,197	2.842,99	2.800,249	2.828,877	2.843,701	2.827,157

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 10** se puede observar que el PDA mostró crecimiento sostenido desde los primeros, con picos entre 5–7 y una subida continua hasta día 9. El aumento 8→9 es moderado en comparación con los saltos previos, lo que sugiere que el micelio en PDA mantiene altas tasas, pero la pendiente tiende a estabilizarse en torno a valores superiores a 4.8–5.2k mm²/día.

PDA y EMA permanecen muy por encima de AN en términos absolutos en día 9, con PDA liderando ligeramente. EMA mostró un crecimiento más pronunciado entre 8→9 en porcentaje absoluto que PDA, reduciendo la brecha;

AN presenta el mayor aumento relativo en todos los días, recuperando parte del rezago respecto a PDA y EMA, a pesar de este fuerte porcentaje de crecimiento, su valor absoluto en día 9 sigue siendo considerablemente menor que el de PDA y EMA, por lo que AN continúa siendo la opción con menor área colonizada en el periodo.

Día 10

El 30 de noviembre de 2024 se realizó la última medición del crecimiento micelial del hongo en los tres medios, ya se pudo observar que se logró cubrir toda la superficie de la caja Petri en algunas repeticiones, como se verá en los datos de la siguiente tabla. Revisar registros fotográficos en el **Anexo 46, 47 y 48**.

Tabla 11: Tasa de crecimiento del Día 10

Medio de cultivo	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	$\bar{x}$
PDA	T1	7.034,400	6.887,940	6.961,294	7.047,414	6.954,618	6.976,890
EMA	T2	7.190,398	7.083,117	6.496,047	6.821,051	6.397,237	6.790,380
AN	T3	3.024,551	3.391,925	3.253,623	3.393,519	3.301,524	3.270,151

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 11** se puede observar que PDA y EMA experimentaron un incremento marcadamente mayor que AN, y convergen en valores máximos semejantes al cierre del seguimiento.

Aunque PDA es el mejor medio en la medición final por pequeña diferencia media ($\approx 0.179 \text{ mm}^2/\text{día}$), EMA muestra un comportamiento más consistente a lo largo del experimento (valores altos desde días tempranos) pero con mayor dispersión en la última medición debido a repeticiones más variables.

AN presenta claramente menor capacidad de expansión acumulada durante todo el periodo; su aumento final es modesto y no alcanza las magnitudes de PDA/EMA.

Discusión

Se procederá a describir cada medio resaltando las ventajas que se obtuvo de ellos, así como sus limitaciones:

PDA (T1) fuerte respuesta relativa y picos rápidos entre días intermedios (5→7); terminó con la media más alta en el último día; útil cuando se busca lograr una colonización explosiva o alcanzar un máximo en un horizonte concreto, lo malo menor rendimiento inicial; la respuesta depende de superar una fase de latencia.

EMA (T2) crecimiento precoz y sostenido; valores altos desde día 2; consistencia entre repeticiones en la mayor parte del seguimiento, buena opción cuando interesa acumular crecimiento constante a lo largo del tiempo; presentó algo más de dispersión en la última medición; posible sensibilidad a condiciones experimentales que generan repeticiones atípicas en momentos puntuales.

AN (T3) presentó estabilidad moderada; menor variabilidad extrema en algunas etapas; puede reflejar condiciones más conservadoras de nutrición/estructura de sustrato. Presentó el crecimiento absoluto inferior; menor aceleración entre todos los medios ventanas críticas comenzando del día 5.

3.3.2 Medición del crecimiento micelial a los 10 días

Para la toma de datos se midió a través de la aplicación imageJ tomando fotos de las cajas Petri hasta que se llene completamente, se midió el área colonizada en (mm²) del micelio del hongo *Pleorotus ostreatus*, a continuación, mostramos los datos obtenidos. A continuación, se muestran los resultados de dicho ensayo.

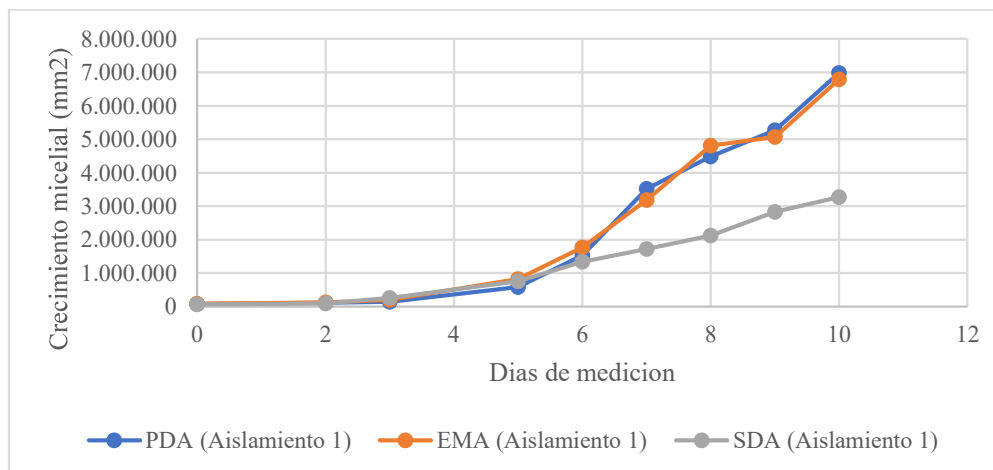
Tabla 12: Registro del crecimiento micelial a los 10 días después de la inoculación

	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{x}$
PDA	T1	9836,5	8796,4	8870,9	11529,6	9810,5	48843,9	9768,8
EMA	T2	7149,7	9421,6	8676,2	7768,7	8588,0	41604,2	8320,8
AN	T3	5239,0	5861,8	4795,2	5002,8	4754,7	25653,5	5130,7
	Σ	22225,1	24079,8	22342,4	24301,2	23153,2		

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 12** nos muestra el crecimiento micelial a los 10 días de inoculación donde se puede observar que en el medio PDA el crecimiento promedio fue superior a los otros medios obteniendo un valor de 9768.8 mm² a los 10 días. Después le sigue el EMA como el segundo medio que obtuvo mejor promedio y por último está AN que obtuvo el menor rendimiento con un valor de 5130,7 mm².

Gráfica 1: Comparación de tasa de crecimiento micelial en los tratamientos



Fuente: Elaboración propia.

En el **gráfico 1** se puede observar un resumen de los datos obtenidos del área total por día donde se puede apreciar las distintas variaciones que tuvieron los distintos medios y quedan el mayor rendimiento del medio PDA.

Tabla 13: Análisis de Varianza: crecimiento micelial a los 10 días después de la inoculación.

F. de V.	GL	SC	CM	Valor Fc	Ft (5%)	Ft (1%)
Trats	2	56308854.98	28154427.49	38.56	3.89	6.93
Error	12	8761042.07	730086.84			
Total	14	65069897.05				
CV	11.03927					

Fuente: Elaboración propia.

Cómo se puede observar en la **Tabla 13**, en el ANOVA se obtiene una probabilidad de $F_c > F_t$ que indica que hay diferencias altamente significativas debido al efecto de los medios de cultivo en el crecimiento y colonización de los inóculos del hongo Ostra.

Así mismo se observa que el coeficiente de variación es 11.04 lo cual indica que los datos procesados son consistentes estadísticamente.

Por tanto, procede realizar una prueba de comparación de medias por Tukey (0.05).

Tratamiento	Media	
T1	9768,8	A
T2	8320,8	B
T3	5130,7	C

Fuente: Elaboración propia.

De la tabla precedente podemos indicar que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre el tratamiento A (PDA) y el tratamiento B (EMAXAN), así como existen diferencias significativas entre el tratamiento B (EMAXAN) y el tratamiento C (AGAR NUTRIENTE).

3.4 Tiempo de colonización completa

Para poder evaluar que medio de cultivo fue el más rápido en colonizar completamente las cajas Petri, se procedió a realizar una toma de dato del tiempo en días que cada repetición le tomo, se realizó un análisis de varianza para poder determinar cuál sería el medio más efectivo en tiempo de colonización. Los datos obtenidos son los siguientes:

Tabla 14: Registro del Tiempo de colonización completa

	Trat.	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{x}$
PDA	T1	9	12	9	10	10	50	10.0
EMA	T2	10	10	11	13	12	56	11.2
AN	T3	12	14	15	15	16	72	14.4
	Σ	31	36	35	38	38		

Fuente: Elaboración propia.

En la **Tabla 14** se puede observar la toma del tiempo en días de colonización que tardo cada repetición en completar el área total de la caja Petri, el tratamiento más rápido fue en el medio PDA tardando una media de 10 días, mientras que el que más tardo fue el medio AN también algunas muestras superaron los 15 días para poder llegar a completar la caja Petri.

Tabla 15: Análisis de Varianza: Tiempo de colonización completa

F. de V.	GL	SC	CM	Valor Fc	Ft (5%)	Ft (1%)
Trats	2	51.73	25.866	14.11	3.89	6.93
Error	12	22.00	1.833			
Total	14	73.73				

Fuente: Elaboración propia.

Cómo se puede observar en la **Tabla 15**, en el ANOVA se obtiene una probabilidad de $F_c > F_t$ que indica que hay diferencias altamente significativas debido a las diferencias de los medios de cultivo en el crecimiento y tiempo de colonización del hongo ostra.

Por tanto, procede realizar una prueba de comparación de medias por Tukey (0.05).

Tratamiento	Media	
T1	10.0	A
T2	11.2	B
T3	14.4	C

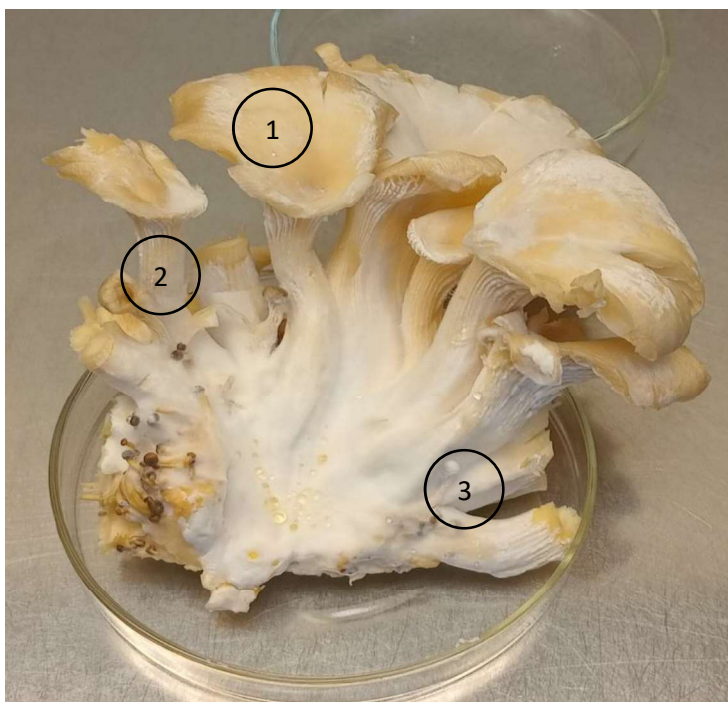
Fuente: Elaboración propia.

De la tabla precedente podemos indicar que existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento A (PDA) y el tratamiento B (EMAXAN), así como existen diferencias significativas entre el tratamiento B (EMAXAN) y el tratamiento C (AGAR NUTRIENTE).

3.5 Identificación del Hongo *Pleorotus Ostreatus*

3.5.1 Descripción Macroscópica

Imagen 10: Hongo Ostra identificación macroscópica



Píleo (1) plano convexo, margen recto, borde decurvado a incurvado, superficie seca cerosa, color gris con el centro gris oscuro, cutícula desprendible, consistencia carnosa-esponjosa, color blanco, **sabor** un poco afrutado, **olor** terroso.

Himenio (2) con láminas decurrentes, anchas, onduladas, borde entero, color blanquecino, lámelulas subtruncadas, concoloras con las láminas se continúan con una línea hacia el estípite. Trama lamelar irregular. **Estípite (3)** en la base, cilíndrico, ondulado, atenuado hacia la base, excéntrico a lateral, superficie fibrilosa longitudinalmente, finamente tomentosa hacia la base, color blanco a amarillento. Contexto lleno, consistencia carnosa a fibrilosa, color blanco.

Micelio es blanco a blanquecino, con textura algodonosa o filamentosa, se puede observar el crecimiento de las hifas en la caja Petri, y como se pudo describir anteriormente tuvo crecimiento uniforme con una buena densidad en el mejor medio que fue el PDA (Acosta-Urdapilleta, 2016).

Descripción Microscópica

Las **hifas** son septadas (con tabiques transversales) y presentan puentes de unión, rasgo típico de Basidiomycota. Cada compartimento suele contener uno o dos núcleos. Esto permite un control más fino del transporte de nutrientes y organelos dentro de la hifa, y también facilita la compartimentación en caso de daño.

Estas conexiones ayudan a mantener el estado dicariótico del micelio, esencial para la formación de cuerpos fructíferos; son pequeñas estructuras en forma de “gancho” o “puente” que aparecen en las hifas dicarióticas (cuando cada célula tiene dos núcleos distintos, uno de cada progenitor), su función es asegurar que, tras la división celular, cada compartimento de la hifa reciba un núcleo de cada tipo.

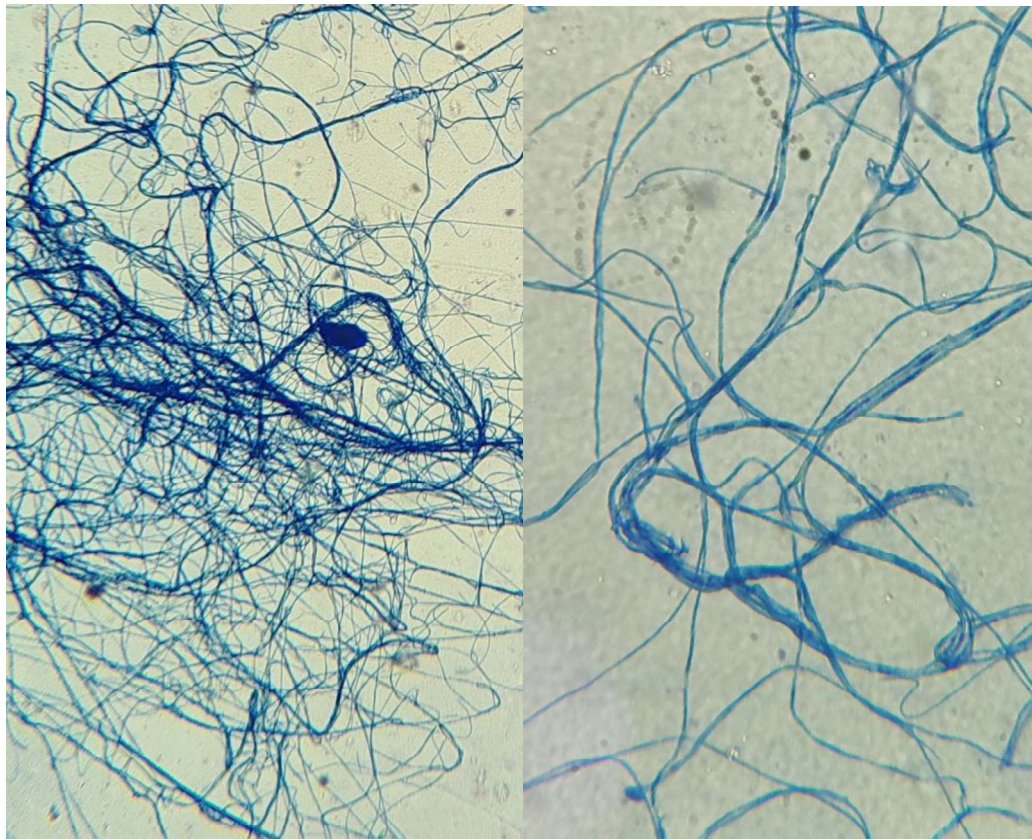
Esporas que produce *Pleurotus ostreatus* son basidiósporas sexuales, formadas en los basidios del himenio de los cuerpos fructíferos. Estas esporas son hialinas (transparentes), lisas, elípticas a cilíndricas, de tamaño pequeño ($\approx 7-9.5 \times 2.5-3.5 \mu\text{m}$). (Perez Briceyda, 2006), la huella de esporas del hongo es de color blanco a gris lila y se ve mejor sobre un fondo oscuro.

En condiciones naturales, *Pleurotus* no produce conidios ni esporas asexuales típicas; la reproducción asexual ocurre principalmente por expansión clonal del micelio, es decir, el micelio mismo se propaga vegetativamente.

3.6 Identificación microscópica

Se identificó el micelio del hongo por medio de la técnica de la cinta adhesiva, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol, se cortó un poco de cinta y se presionó sobre el micelio del hongo luego, se fijó en el portaobjeto y se observó en el microscopio donde se pudo ver las hifas y las esporas.

Imagen 11: Estructura hifal de *Pleurotus ostreatus* bajo microscopio



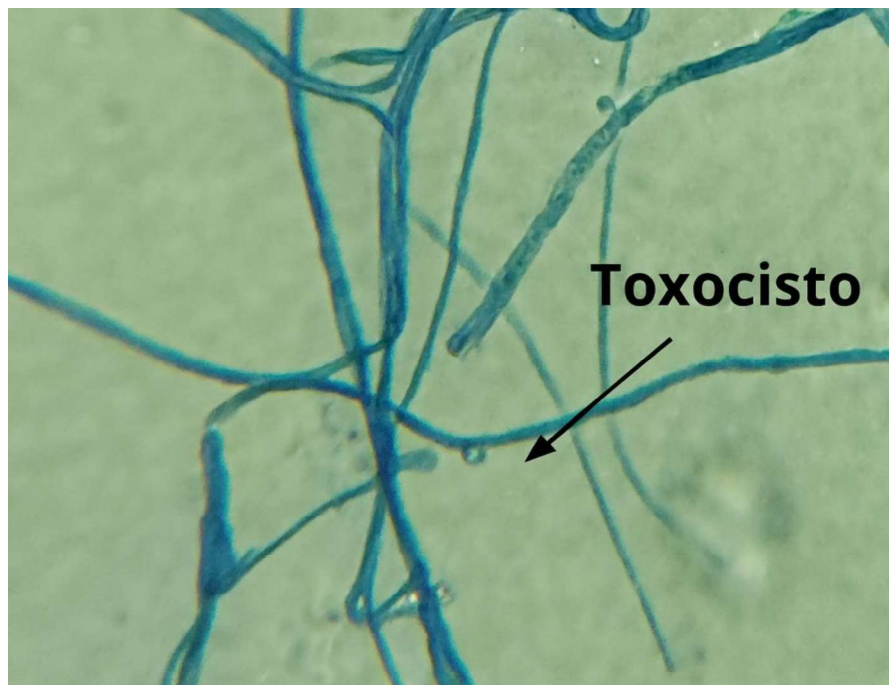
Los filamentos largos y ramificados que se ven son hifas, estructuras multicelulares que forman el micelio. En *Pleurotus*, estas hifas están divididas por tabiques transversales (septos), lo que permite compartimentar el flujo de nutrientes y núcleos. Aunque no siempre visibles con tinciones simples, *Pleurotus* presenta puentes microscópicos entre compartimentos hifales llamados clamp connection (puentes de conexión).

3.7 Estructuras en las hifas de *Pleurotus ostreatus*

Los hongos del género *Pleurotus*, secretan diversas enzimas, como las lacasas, que se ha propuesto están involucradas en mecanismos de degradación de compuestos lignocelulósicos.

Este proceso se lleva a cabo por medio de las nematotoxinas que produce el hongo, que inmovilizan al contacto al nematodo presente y posteriormente el micelio del hongo invade con sus hifas los orificios corporales del nematodo hasta que finalmente, se alimenta de él para obtener los nutrientes, esta actividad contra nematodos tiene gran importancia desde el punto de vista agrícola y pecuario incluso en el biocontrol de plagas ya que también se menciona su acción en algunos insectos y en otros hongos. El hongo ostra genera metabolitos, sólo en unos cuantos casos se ha evidenciado que son producidos en zonas específicas de las hifas, diferenciadas morfológicamente para formar estructuras especializadas denominadas toxocistos.

Imagen 12: Estructura hifal con estructura tipo toxocisto



La imagen muestra claramente una estructura tipo toxocisto, integrada en el micelio de *Pleurotus ostreatus*. Esta célula especializada es un rasgo distintivo del género, con funciones que van más allá del crecimiento: defensa, adaptación ecológica y posible producción de metabolitos bioactivos como se mencione anteriormente tiene una importancia agrícola. Su observación microscópica aporta valor tanto para la identificación taxonómica como para el entendimiento funcional del hongo en cultivo y en la naturaleza.

Identificación Práctica

Se realizó la elaboración del sustrato para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* comienza con la selección de materiales orgánicos disponibles localmente, en este caso se uso cáscara de arveja, yerba mate usada y cascarilla de arroz, todos ellos ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes esenciales para el desarrollo del micelio. Estos residuos se mezclaron en proporciones equilibradas para asegurar una buena aireación, retención de humedad y estructura física adecuada. Una vez formulado, el sustrato se sometio a un proceso de pasteurización mediante inmersión en agua caliente a 60–70 °C durante 1 a 2 horas, con el objetivo de eliminar microorganismos competidores sin destruir los nutrientes. Luego se escurrio y se dejo enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. En condiciones asépticas, se procede a la inoculación del sustrato con micelio madre o comercial, distribuyéndolo de manera homogénea. Finalmente, el sustrato inoculado se coloco en bolsas o recipientes con filtros para intercambio gaseoso, en este caso se uso botellas plásticas y se mantuvo en condiciones controladas de temperatura (24–28 °C), humedad (80–90%) y oscuridad parcial para favorecer la colonización micelial. Este proceso garantiza un medio nutritivo, libre de contaminantes y estructuralmente óptimo para el crecimiento vigoroso del hongo ostra.

A partir de la siembra, el micelio inicio su fase de adaptación, expandiéndose lentamente durante los primeros días. Entre el día 4 y el 10, se observó una colonización progresiva del sustrato, con crecimiento radial del micelio, formación de redes hifales blancas y algodonosas, y desarrollo de estructuras septadas con conexiones en pinza, típicas del género *Pleurotus*. Hacia el día 11 a 14, el sustrato se encuentra completamente colonizado, con el micelio cubriendo toda la superficie de forma densa y uniforme. En este punto, el cultivo está listo para inducir la formación de primordios mediante cambios en temperatura, luz y ventilación, marcando el inicio de la fase reproductiva.

Imagen 13: Formación de primordios. Día 15 - 20



En este punto, se indujo a la fructificación mediante cambios ambientales: se redujo la temperatura a un rango de 18–22 °C, se incrementó la humedad relativa a 90–95%, se mejoró la ventilación y se introdujo luz difusa durante varias horas al día; estas condiciones estimulan la formación de primordios, pequeñas protuberancias blancas que emergen del micelio y representan el inicio de los cuerpos fructíferos.

Durante los siguientes días (15 a 20), los primordios crecieron rápidamente, desarrollando sombreros redondeados y láminas bien definidas, el crecimiento es acelerado si se mantienen condiciones óptimas de humedad, temperatura y oxigenación. Los cuerpos fructíferos adquieren su forma característica de abanico, con sombreros de color blanco a gris claro y láminas que contienen los basidios productores de esporas sexuales.

Imagen 14: Desarrollo de cuerpos fructíferos. Día 21–28



La cosecha se realizó a partir del día 28, dependiendo del ritmo de desarrollo se puede cosechar antes. Se recomienda recolectar los hongos cuando los sombreros están completamente formados, pero antes de que las láminas comiencen a oscurecer o liberar esporas en exceso. La recolección debe hacerse con cuchilla limpia, cortando en la base sin dañar el micelio, lo que permite la aparición de nuevas oleadas (flushes) en los días siguientes. Este proceso culmina el ciclo productivo y permite evaluar el rendimiento del cultivo en función del sustrato utilizado y las condiciones de manejo.

Imagen 15: Hongos ostras listos para cosecha. Día 28



El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en el sustrato con cáscara de arveja, yerba usada y cascarilla de arroz fue eficiente, sostenible y permite una identificación clara del micelio por sus características morfológicas. En condiciones óptimas, el ciclo completo hasta la cosecha se logró en 4 semanas, con posibilidad de múltiples cosechas si se mantiene el sustrato en condiciones adecuadas.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Según los objetivos planteados se pudo determinar que el mejor comportamiento del micelio del hongo (*Pleurotus ostreatus*) fue en el medio PDA los resultados evidencian que es el más adecuado para favorecer el crecimiento del micelio. También se pudo comparar la tasa de crecimiento en los distintos medios donde el medio PDA mostró la mayor ganancia relativa en crecimiento y alcanzó la media más alta en la medición final, lo que indica la capacidad de expansión fuertemente cuando el micelio supera la fase de latencia, es decir una ya vez activo el micelio se expande más rápido en el medio, también fue el primer medio en cubrir toda la caja Petri en todas las réplicas más rápido, tuvo una media total de 10 días que tardaron todas las repeticiones en completar el área total de la caja Petri. El último de los objetivos fue la determinación del tipo de aislamiento más eficiente, que en este caso fue el Aislamiento 1 (A1) que se trata de inoculación a partir de grano miceliado obteniendo un crecimiento de las colonias formadas del micelio sin presentar contaminaciones a comparación del otro aislamiento.
- El PDA es más adaptable a la cultivación comercial con tiempos de producción optimizados si el manejo del cultivo permite controlar la fase inicial y se necesita un rendimiento máximo en un plazo menor o de menor tiempo. Se considerará costos de medio y una facilidad de preparación.
- EMA mostró un crecimiento continuo con buena consistencia; donde se minimizo el tiempo necesario para alcanzar áreas grandes en general, también mostró homogeneidad entre las réplicas; se pudo notar el balance entre rapidez y rendimiento final, los datos son más predecibles para investigación comparativa. Si se busca estabilidad experimental y menor riesgo de repeticiones con variaciones extremas el EMA es una buena alternativa.

- AN puede ser aceptable si se valora menor exigencia nutritiva y estabilidad moderada, pero no si la meta es maximizar producción o reducir tiempo de ciclo. Si se requiere condiciones limitadas de nutrientes o búsqueda de tolerancia a estrés del sustrato este medio será ideal. Subóptimo Desempeño de AN, este medio presenta un crecimiento lento, con menor densidad y ausencia de exudado, lo que lo convierte en la opción menos recomendable para el cultivo del micelio de este hongo en las condiciones evaluadas.

4.2 Recomendaciones

- Se podría considerar comparar diferentes condiciones de esterilidad, estrategias para inhibir el crecimiento de contaminantes, e incluso ajustar la composición de los medios (por ejemplo, variaciones en pH o incorporación de agentes antimicrobianos) que potencialmente puedan mejorar aún más la pureza y productividad del cultivo. Además, estudiar el impacto de variables ambientales (temperatura, humedad, etc.) complementaría el análisis y proporcionaría una visión holística sobre el cultivo óptimo de este hongo.
- Se recomienda la prueba de tipos de sustratos que sean adaptables para este tipo de hongos tomando en cuenta la disponibilidad de la región de ciertos productos que contengan lignina y celulosa, se podría probar con productos orgánicos que son desechados en las casas, se ponía ejemplo la yerba usada, cartones de huevo, la borra del café, se podría probar más productos agroecológicos.
- Optimización de la Composición del Medio:
 - Dado el desempeño sobresaliente de PDA, se sugiere profundizar en la modificación de este medio para extraer el máximo potencial del cultivo, y talvez obtener este medio de forma casera.
 - Para EMA, podría ser útil investigar si ajustes en la composición (por ejemplo, en la fuente de carbono o en el balance de nutrientes) pueden reducir la variabilidad en la respuesta metabólica y en la producción de pigmentos, con esto se podría estandarizar una fórmula de un medio alternativo que talvez sirva para el estudio de otros hongos.

- Una constante evaluación de factores ambientales durante la incubación, como la temperatura y la humedad, podría ayudar a explicar y reducir las discrepancias en el desarrollo del micelio entre diferentes réplicas.
- Las diferencias observadas entre aislamientos dentro de cada medio subrayan la importancia de controlar exactamente las condiciones experimentales (inoculo, manipulación, esterilidad) para obtener resultados reproducibles y consistentes.
- La producción de exudado (observado principalmente en PDA y EMA) puede ser un indicador indirecto de la actividad metabólica y del estado nutricional del hongo. Realizar estudios que correlacionen las características del exudado con parámetros de salud y vigor del micelio podría resultar valioso para optimizar el proceso de cultivo.
- Considerar la realización de un mayor número de réplicas ayudaría a confirmar la consistencia de los resultados y permitir la extrapolación de estos hallazgos a una escala mayor, lo que es fundamental para aplicaciones comerciales o de investigación avanzada.