

Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera

Daniel Alfredo Martínez¹, María Belén Buglione¹, Marcela Viviana Filippi², Liliana del Carmen Reynoso², Gustavo Enrique Rodríguez³ & Marta Susana Agüero¹

1 Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial, Sede Alto Valle y Valle Medio, Universidad Nacional de Río Negro. Pacheco 460. (8360) Choele Choel, Río Negro, Argentina.

2 Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente. Sede Alto Valle y Valle Medio, Universidad Nacional de Río Negro. Tacuarí 669 – (8336) Villa Regina, Río Negro, Argentina.

3 Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. Ruta Nacional 151, km 12,5. C.C. 85. (8303) Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

Resumen

Correspondencia

MS. Agüero

E-mail: maguero@unrn.edu.ar

Recibido: 24 julio 2014

Aceptado: 27 enero 2015

Publicado on-line: 6 febrero 2015

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de tres cepas de *Pleurotus ostreatus* y una de *Agrocybe aegerita* para colonizar la biomasa generada por las industrias jugueras (orujo) y comparar las curvas de crecimiento micelial. El aprovechamiento de estos residuos lignocelulósicos permitiría brindar opciones para la disposición final de esta biomasa residual. Como sustratos se emplearon dos tipos de orujos de pera, uno sometido a un tratamiento enzimático previo a la extracción de jugo y otro sin tratar. *A. aegerita* evidenció menor crecimiento que *P. ostreatus* en ambos sustratos, mientras que *P. ostreatus* presentó mejor desarrollo sobre el orujo con pretratamiento enzimático, comportamiento que podría estar relacionado con la composición química de los orujos de pera analizados.

Palabras clave: Hongos comestibles, Fermentación en fase sólida, Velocidad de crecimiento, Sustratos lignocelulósicos, Deshechos agroindustriales.

Mycelial growth evaluation of Pleurotus ostreatus and Agrocybe aegerita on pear pomaces

Abstract

The aim of this study was to evaluate the ability of three strains of *Pleurotus ostreatus* and one of *Agrocybe aegerita* to colonize the biomass generated by juicers industries (pomace) and to compare the mycelial growth curves. The use of these lignocellulosic waste could provide options for the disposal of this waste biomass. Two types pomace of pear were used as substrates, one subjected to a preliminary enzymatic treatment prior to juice extraction and other without treatment. *A. aegerita* showed slower growth than *P. ostreatus* on both substrates, while *P. ostreatus* showed better development on the pear pomace with enzymatic pretreatment, behavior that could be related with the chemical characteristics of the substrates.

Key words: Edible mushrooms, Solid state fermentation, Growth rate, Lignocellulosic substrate, Agro-industrial wastes.

Introducción

La actividad de la agroindustria alimentaria ligada a la extracción de jugos de frutos de pepita genera residuos denominados orujos y/o bagazos de naturaleza lignocelulósica, que representan el 60 % de la fruta procesada.

En los valles irrigados de Río Negro y Neuquén (Argentina), la actividad frutícola se ha incrementado significativamente en los últimos 10 años y representa el 85 % de la producción nacional de manzanas y el 75 % de pera. Según la información aportada por la Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FunBaPa 2013), en el año 2013 la Argentina produjo un total de 1,4 millones de toneladas de manzanas y peras. La fruta de menor calidad (descarte de productores primarios y empaques), aproximadamente el 41 % de la producción de manzana y el 27 % de pera, se procesa con fines industriales para la elaboración, principalmente de jugos concentrados, y en menor medida, de sidra y conservas. Se estima que en el año 2013, en la región de los valles irrigados de Río Negro y Neuquén la actividad de estas agroindustrias generó 270.000 toneladas de orujos.

La disposición inadecuada de estos residuos sólidos puede dar origen a serios problemas de contaminación y alteración del medio ambiente en los lugares donde se acumulan. La fermentación natural de estos desechos tiene como resultado la producción de ácidos orgánicos como el ácido acético, la emisión de metano, sulfuro de hidrógeno, entre otros gases, que producen problemas de contaminación ambiental (Frioni 1999).

Para reciclar los desechos agroindustriales, una posibilidad es el empleo de hongos de pudrición blanca ya que son los únicos organismos capaces de degradar completamente la lignina, utilizando el C y N, además de otros nutrientes para su propio metabolismo. Dentro de este grupo, una de las especies comestibles que se cultivan a escala comercial es *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer; conocida con el nombre de gírgola u hongo ostra. Este género se destaca por su capacidad para degradar lignina selectivamente, sacarificar e hidrolizar celulosa y producir cuerpos fructíferos de elevada calidad nutritiva (Sánchez *et al.* 2008).

Desde este enfoque, el cultivo de estos hongos es un sistema de bioconversión ecológica ya que permite producir setas para consumo humano y reciclar los desechos lignocelulósicos. Por otra parte, el sustrato biodegradado puede ser utilizado

en alimentación animal y como abono orgánico mediante procesos de composteo y vermicomposteo, reduciendo de este modo el impacto ambiental (ten Have & Teunissen 2001, Bonatti *et al.* 2004, Sánchez 2004, Pozzi *et al.* 2010, Andrino *et al.* 2011).

La lignina es un complejo químico aromático fenólico localizado entre las moléculas de celulosa de la pared vegetal, lo que hace muy difícil su degradación. Los hongos de pudrición blanca son considerados como agentes primarios de descomposición de compuestos lignocelulósicos porque son capaces de utilizar los desechos agrícolas en su forma original sin que hayan sido sujetos previamente a algún proceso de degradación bioquímico o microbiológico (ten Have & Teunissen 2001, Howard *et al.* 2003, Sánchez 2010).

Diversos autores han demostrado la capacidad de estos hongos para colonizar una gran variedad de sustratos lignocelulósicos mediante fermentación en fase sólida, caracterizando las etapas de crecimiento micelial y producción de carpóforos. La mayoría de los trabajos estudiaron este proceso de bioconversión empleando subproductos forestales, agrícolas y agroindustriales como aserrín de abedul (*Betula pendula* L.), haya (*Fagus sylvatica* L.), roble (*Quercus petraea* L.), entre otros, pajas de trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.) y algodón (*Gossypium herbaceum* L.), cáscara de maní (*Arachis hypogaea* L.), bagazos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y de la industria cervecera y olivera (Philippoussis *et al.* 2001, Nyochembeng *et al.* 2008, Rizki & Tamai 2011, Jasińska *et al.* 2012).

Por su parte, el empleo de residuos provenientes de la actividad de industrias relacionadas con la extracción de jugos de frutas ha sido menos investigado. Sánchez *et al.* (2002) evaluaron la biodegradación por *Pleurotus* spp. de desechos de la vitivinicultura, e informaron que los mejores sustratos para el crecimiento del micelio y rendimiento de cuerpos fructíferos se obtenían al adicionar una elevada proporción de residuos de cosecha de la vid al orujo de uva. Nicolini *et al.* (1987) caracterizaron químicamente el proceso de biodegradación en fase sólida de residuos provenientes de la extracción de jugo de naranja y de la producción de vinos por *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing y *P. ostreatus*. Los resultados publicados muestran un incremento en el valor alimenticio del residuo biodegradado y la factibilidad de su utilización en la

alimentación animal.

En general, los hongos comestibles son apreciados por su valor nutricional y medicinal. En este caso, las características nutraceuticas de *P. ostreatus* están relacionadas con el contenido de aminoácidos esenciales y vitaminas, así como con la producción de sustancias bioactivas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Karaman *et al.* 2010, Patil *et al.* 2010, Sánchez 2010, Vega & Franco 2013).

De acuerdo a lo informado por Royse (2014), basado en los datos aportados por la Chinese Edible Fungi Association (CEFA), la producción mundial de hongos comestibles se incrementó más de 25 veces desde 1978, alcanzando aproximadamente 27 millones de toneladas en 2012. El género *Agaricus* L.:Fr. emend Karst., principalmente el champiñón, *A. bisporus* (J.E.Lange) Imbach, contribuye con el 30 % de la productividad. El segundo lugar lo ocupan las especies del género *Pleurotus* (Jacq.) P. Kumm. con el 27 %. Y, en tercer lugar, se encuentra *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake), con cerca del 17 %.

En Argentina, *P. ostreatus* se cultiva comercialmente desde hace cerca de 30 años (Albertó 2014). En la región del Alto Valle del Río Negro y Neuquén la producción de hongos gírgolas se inició hace unos 20 años. El cultivo se realiza sobre tocones de madera blanda como el álamo (*Populus alba* L.) para su consumo en fresco, deshidratado y en conserva (De Michelis *et al.* 2009, Zunino 2010). Si bien estas experiencias regionales están relacionadas con el cultivo de *P. ostreatus*, el sustrato que emplean (tocones de álamo), no implica la utilización y bioconversión de residuos agroindustriales.

En virtud de la problemática ambiental que se establece en torno a la acumulación de residuos sólidos de alto contenido orgánico por las industrias frutícolas de la región y de la creciente necesidad de certificación de gestión ambiental bajo normas internacionales de la serie ISO 14000 (Cascio *et al.* 1997) de los procesos productivos, resulta de interés considerar el bagazo de pera y manzana como elementos potenciales en la elaboración de sustratos para la producción de hongos comestibles.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *P. ostreatus* y *A. aegerita*, para colonizar residuos de las industrias ligadas a la extracción de jugos de pera y comparar las curvas de creci-

miento sobre estos sustratos durante la etapa de desarrollo micelial en ensayos de fermentación en fase sólida.

Los resultados obtenidos en esta etapa corresponden al inicio de una línea de investigación con estas especies tendientes a seleccionar las combinaciones cepas-sustratos más apropiadas para la bioconversión de orujos provenientes de industrias agroalimentarias y la producción de hongos comestibles.

Material y métodos

Material fúngico

Para este trabajo se emplearon tres cepas de *P. ostreatus* y una de *A. aegerita*, depositadas en el Cepario FACA-UNCo, Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales, cuyas procedencias se describen a continuación.

Cepas de *P. ostreatus*:

PI-AA: Paraje Abra Ancha, Neuquén, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-AA 03.

PI-J: Misiones, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-J 07.

PI-P: Paraje Abra Ancha, Neuquén, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-P 12.

Cepa de *A. aegerita*:

Ag-I: Torino, Italia. Colector: Rodríguez G. FACA-AgI 22.

Todas las cepas fueron conservadas en Agar extracto de malta (AEM) a 4°C en oscuridad. El medio de cultivo fue preparado al 10 % p/v, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (AEM Britania® B0100406).

Las cepas en estudio se multiplicaron en medio APG (Agar papa glucosado), que se preparó con una infusión de papa (*Solanum tuberosum* L.), D (+) glucosa y agar-agar según las especificaciones descritas por Merck (2005). Para ello se colocaron 20 mL del medio de cultivo en cajas de Petri de 100 mm de diámetro, se inocularon con las cepas mencionadas y se incubaron a 28 ± 1 °C durante dos semanas con el objeto de obtener micelio activo para los ensayos de crecimiento en cajas de Petri sobre medio AEM y sobre orujo de pera.

Sustratos

Como sustratos para estudiar el crecimiento se emplearon orujos de pera (*Pyrus communis* L.)

var. Williams Bon Chetrien, provenientes de dos industrias jugueras de la provincia de Río Negro (Argentina), una ubicada en la localidad de Luis Beltrán, y la segunda en Villa Regina. Ambas producen residuos constituidos por cáscara, semillas y restos de pulpa aunque aplican distintas tecnologías para la extracción de jugos. La diferencia se basa en que la primera industria realiza un tratamiento de la pulpa con pectinasas y celulasas previo al proceso de extracción de jugos (Ovando-Chacón & Waliszewski 2005). De esta manera, se obtienen dos tipos de orujo de pera con y sin tratamiento enzimático (O+Ez y O respectivamente). Posteriormente, el orujo fue secado al aire y triturado con una moladora comercial de granos con lo cual se obtuvo un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 y 5 mm de diámetro.

Composición química de los orujos

Con el propósito de comparar la composición química de los orujos de pera (O+Ez y O), en relación a la capacidad de desarrollo micelial de las cepas analizadas en este trabajo, se prepararon muestras compuestas a partir de la selección al azar de tres submuestras de cada orujo. Se llevaron a peso seco a 65°C y se trituraron hasta un tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm. Se midió el pH de los orujos previamente hidratados con agua al 70 % (p/p). Sobre las muestras secas se determinó el contenido de nitrógeno total (N) por el método de Kjeldahl, cenizas totales (Cen), fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA) y lignina en detergente ácido (LDA), de acuerdo a la metodología descrita en Van Soest *et al.* (1991) y Horwitz (2002). Las determinaciones se realizaron por duplicado. El contenido de materia orgánica (MO) se obtuvo por diferencia entre materia seca (MS) y Cen. El de carbono orgánico (C) dividiendo el valor de MO por 1,724. El nivel de celulosa se calculó como FDA-LDA.

Ensayos de crecimiento en caja de Petri

El crecimiento micelial de las cepas de seleccionadas se estudió sobre medio AEM y sobre orujos de pera (O+Ez y O) como sustrato.

Los ensayos sobre AEM se realizaron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro que contenían 30 mL del medio de cultivo. Para los experimentos con orujo de pera como sustrato, el orujo se hidrató al 70 % (p/p) en recipientes cerrados con agua destilada durante 24 hs y se colocaron 20-25 gramos del orujo hidratado por caja de Petri.

Posteriormente, las cajas conteniendo el medio de cultivo y el sustrato se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 atm de presión, durante 20 min. Las cajas se inocularon con implantes de micelio activo de 5 mm de diámetro desarrollado sobre medio APG y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un período de 10-12 días.

Determinación de la velocidad de crecimiento micelial

El crecimiento de los hongos fue estimado en base al diámetro de la colonia fúngica. A intervalos de 24-48 h se midieron cuatro diámetros, en ángulos de 0°, 45°, 90° y 135°, trazados sobre imágenes digitales del cultivo, tomando como intersección el centro del inóculo. El diámetro medio (D) del micelio se calculó en base al promedio de las cuatro mediciones. Este método incorpora dos diámetros adicionales respecto de los empleados por Gaitán-Hernández (2005) y Sánchez *et al.* (2008), lo cual conferiría una mayor exactitud en la estimación del diámetro medio.

Se realizó el ajuste a un modelo logístico (Sarıkaya & Ladisch 1997) de D en función del tiempo t mediante la función (1). La velocidad máxima de crecimiento micelial (v_{\max}) se calculó a partir de la pendiente máxima de la tangente a la curva del modelo logístico. El valor de v_{\max} se obtuvo mediante la expresión (2), y el tiempo en alcanzar la v_{\max} (t_{\max}) con la fórmula (3). Se determinó también el tiempo de latencia (t_{lat}) con la expresión (4), como el punto en el que la máxima tangente intercepta el eje horizontal (Zwietering *et al.* 1990):

$$(1) \quad D(t) = \frac{a}{b + c * e^{-d * t}} \quad (2) \quad v_{\max} = \frac{a * b}{4b}$$

$$(3) \quad t_{\max} = \frac{\ln\left(\frac{c}{b}\right)}{d} \quad (4) \quad t_{\text{lat}} = \frac{\ln\left(\frac{c}{b}\right) - 2}{d}$$

donde a, b, c y d son constantes de ajuste del modelo.

Diseño experimental y análisis estadístico

En un primer experimento, se emplearon las cepas de *P. ostreatus* PI-AA, PI-P, PI-J y *A. aegerita* Ag-I, cultivadas en medio AEM y orujo de pera con tratamiento enzimático previo el proceso de extracción de jugos (O+Ez). En un segundo ensayo, se seleccionaron la cepas de *P. ostreatus* PI-P y PI-

J para analizar su desarrollo en los dos tipos de orujo de pera O+Ez y O.

En el análisis de la velocidad de crecimiento de las cepas en medio AEM y orujo O+Ez se empleó un diseño factorial (2 sustratos x 4 cepas) con 3 repeticiones. En el caso de las cepas de *P. ostreatus* cultivadas sobre los sustratos O+Ez y O se usó un diseño factorial (2 sustratos x 2 cepas) con 5 repeticiones.

Los resultados se evaluaron mediante un ANOVA por medio del test LSD Fisher ($p \leq 0,05$) usando la v_{max} como variable dependiente. Previamente se verificó la distribución normal de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilks (Balzarini *et al.* 2008).

Resultados y discusión

Análisis de las curvas de crecimiento micelial

En una primera instancia se seleccionó el medio de cultivo AEM como medio testigo para analizar el ajuste de la curvas de crecimiento de las cepas de *P. ostreatus* y *A. aegerita*, ya que sus características nutritivas favorecen el crecimiento de la mayoría de hongos. De un modo similar, Gaitán-Hernández (2005) seleccionó este medio de cultivo como referencia al evaluar el efecto de distintos suplementos orgánicos sobre el crecimiento micelial de diferentes cepas de *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Qué. Asimismo, Jasińska *et al.* (2012) en estudios sobre la velocidad de crecimiento mi-

celial de dos cepas de *A. aegerita* sobre diversos medios de cultivo que incluían medios comerciales con agar y adicionados de extractos vegetales, informaron que el medio AEM es uno de los más aptos para el desarrollo micelial.

En una segunda etapa, se evaluó la capacidad de las cepas en estudio para colonizar residuos de las industrias ligadas a la extracción de jugos de pera.

Las curvas de crecimiento micelial de las colonias de las cepas estudiadas sobre AEM y orujo de pera (O+Ez y O) mostraron un buen ajuste a un modelo logístico. En todos los casos, los coeficientes de determinación R^2 fueron superiores a 0,97 y, en la mayoría de ellos, próximos a 1 (Tablas 1 y 2).

Este comportamiento, característico del desarrollo microbiano (Madigan *et al.* 2004), evidencia una primera fase de latencia que estaría asociada a la síntesis de enzimas que permiten la utilización de los nutrientes del medio, una segunda fase exponencial en la que se obtiene la velocidad máxima de crecimiento (v_{max}) y una tercera fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye debido, posiblemente, a la menor disponibilidad de nutrientes y a la acumulación de desechos tóxicos.

Este tipo de cinética de crecimiento está de acuerdo con Sarikaya & Ladisch (1997), al describir el modelo de crecimiento de *P. ostreatus* en sistemas de fermentación en fase sólida, empleando residuos de cosecha (tallos, vainas y hojas) de colza (*Brassica napus* L.). Estos autores observa-

Cepas	Medio de cultivo: AEM				Sustrato: O+Ez			
	t_{lat} (día)	t_{max} (día)	v_{max} (cm/día)	R^2	t_{lat} (día)	t_{max} (día)	v_{max} (cm/día)	R^2
PI-AA	2,3 ± 0,1	5,5 ± 0,1	1,86 ± 0,06 ^a	0,99	1,3 ± 0,4	7,2 ± 0,7	1,01 ± 0,05 ^e	0,99
PI-J	2,5 ± 0,2	4,2 ± 0,1	3,04 ± 0,19 ^b	0,99	0,8 ± 0,4	6,3 ± 1,3	0,95 ± 0,05 ^e	0,99
PI-P	3,0 ± 0,3	5,0 ± 0,1	2,64 ± 0,13 ^c	0,97	1,1 ± 0,8	6,4 ± 1,5	0,95 ± 0,14 ^e	0,99
Ag-I	3,0 ± 0,2	8,8 ± 0,8	1,35 ± 0,05 ^d	0,99	0,6 ± 2,1	> 10	0,43* ± 0,10 ^f	0,98

Tabla 1: Desarrollo micelial sobre medio AEM y orujo de pera con tratamiento enzimático previo (O+Ez) evaluado a través de la velocidad de crecimiento micelial máxima (v_{max}), del tiempo en alcanzar la misma (t_{max}) y del tiempo de latencia (t_{lat}) de las cepas de *P. ostreatus* (PI-AA, PI-J, PI-P) y *A. aegerita* (Ag-I). Se muestran los valores medios ± desvíos estándar y los coeficientes de determinación R^2 correspondientes al ajuste de los diámetros miceliales en función del tiempo mediante una función logística.

*Valor estimado asumiendo validez del modelo logístico para tiempos mayores que 10 días. Letras distintas, para una misma fila o columna, indican diferencias significativas ($n = 5$) según el test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Table 1: Mycelial growth on AEM medium and pear pomace with enzymatic pretreatment (O+Ez) evaluated by the maximum mycelial growth rate (v_{max}), the time to reach it (t_{max}) and the lag time (t_{lat}) of strains of *P. ostreatus* (PI-AA, PI-J, PI-P) and *A. aegerita* (Ag-I). Mean values ± standard deviations and coefficients of determination R^2 for the fit of the mycelial diameters versus time using a logistic function are shown.

*Estimated value assuming validity of the logistic model for times longer than 10 days. Different letters, for the same row or column indicate significant differences ($n = 5$) according to Fisher LSD test ($p \leq 0,05$).

Cepas	Sustratos: Orujos de pera							
	O+Ez				O			
	t_{lat} (día)	t_{max} (día)	v_{max} (cm/día)	R^2	t_{lat} (día)	t_{max} (día)	v_{max} (cm/día)	R^2
PI-J	0,6 ± 0,4	5,9 ± 0,6	0,94 ± 0,05 ^a	0,99	1,2 ± 0,5	8,7 ± 1,7	0,77 ± 0,10 ^b	0,99
PI-P	0,8 ± 0,6	6,2 ± 1,2	0,93 ± 0,13 ^a	1,00	2,3 ± 0,7	> 12	0,71* ± 0,07 ^b	1,00

Tabla 2: Efecto del tipo de sustrato sobre la capacidad de crecimiento evaluada a través de la velocidad de crecimiento máxima (v_{max}), del tiempo en alcanzar la misma (t_{max}) y del tiempo de latencia (t_{lat}), para las cepas de *P. ostreatus* (PI-J, PI-P). Se muestran los valores medios ± desvíos estándar y los coeficientes de determinación R^2 correspondientes al ajuste de los diámetros miceliales en función del tiempo mediante una función logística.

*Valor estimado asumiendo validez del modelo logístico para tiempos mayores que 12 días. Letras distintas, tanto para cepas como para sustratos con y sin tratamiento enzimático previo (O+Ez y O), indican diferencias significativas ($n=5$) según el test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Table 2: Effect of substrate type on growth capacity evaluated by the maximum growth rate (v_{max}), the time to reach it (t_{max}) and the lag time (t_{lat}) for strains of *P. ostreatus* (PI-J, PI-P). Mean values ± standard deviations and coefficients of determination R^2 for the fit of the mycelial diameters versus time using a logistic function are shown.

*Estimated value assuming validity of the logistic model for times longer than 12 days. Different letters for both strains as substrates with and without enzymatic treatment (O+Ez and O) indicate significant differences ($n = 5$) according to Fisher LSD test ($p \leq 0.05$).

ron que las mediciones del diámetro micelial presentan un buen ajuste a un modelo logístico, aunque el ajuste resultó mejor aún cuando se utilizó el área de las colonias como variable en lugar de los valores de diámetro micelial promedio.

Por su parte, Gaitán-Hernández (2005) analizó la evolución del diámetro micelial promedio de *P. eryngii* sobre AEM y medios suplementados con paja de trigo, aserrín de encino (*Quercus* sp.) y de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), evidenciándose un comportamiento lineal del diámetro en función del tiempo.

Cabe mencionar que para las curvas de crecimiento de Ag-I sobre orujo de pera, en el tiempo en que se efectuaron las mediciones, los valores experimentales también presentaron un ajuste lineal ($R^2=0,97$). Sin embargo, dado el comportamiento evidenciado sobre AEM, se consideró como válido el ajuste logístico también para Ag-I sobre orujo de pera.

Evaluación de la capacidad de crecimiento de cepas

Según se observa en la figura 1A, el desarrollo de *A. aegerita* sobre AEM fue menor que el de *P. ostreatus* y sólo llegó a cubrir la caja de Petri después de 10 días de incubación a 28°C. Entre las cepas de *P. ostreatus* analizadas, PI-J fue la que evidenció mejor desarrollo logrando colonizar la caja completa luego de 6 días.

El análisis de las curvas de crecimiento evidenció, sin embargo, que el tiempo de latencia (Tabla 1) para *A. aegerita* es similar al de las cepas de *P. ostreatus* ensayadas (2-3 días). Estos

resultados indicarían que ambos tipos de hongos pueden sintetizar las enzimas requeridas para la adecuada utilización de los nutrientes del medio AEM.

En la fase de crecimiento exponencial, en la que se alcanza la velocidad de crecimiento máxima (v_{max}), se observó un comportamiento similar. El valor de v_{max} (Tabla 1) obtenida por ajuste logístico a partir de los datos experimentales representados en la figura 1A para Ag-I resultó un 44 % menor que el correspondiente a PI-J. La evaluación de t_{max} mostró que las cepas de *P. ostreatus* estudiadas lograron alcanzar la v_{max} luego de 4-5 días de incubación en medio AEM, mientras que el tiempo correspondiente a Ag-I, estimado mediante ajuste logístico, fue de aproximadamente 9 días, muy cercano al momento en que el desarrollo de las cepas colonizó la caja completa (Fig. 1 A).

Dado que los resultados correspondientes a la fase de crecimiento exponencial dependen de las condiciones de cultivo (composición del medio, temperatura, etc.) y de las características genéticas de los microorganismos (Madigan *et al.* 2004), sería posible indicar que el medio AEM permite que las cepas de *P. ostreatus* ensayadas alcancen una mayor velocidad de división celular en relación a *A. aegerita* (De León *et al.* 2012).

Entre las cepas de *P. ostreatus* estudiadas se encontraron diferencias significativas en los valores de v_{max} , PI-J presentó el mayor valor (3,04 cm/día) y PI-AA el menor (1,86 cm/día), con lo que se evidencia que PI-J sería la más apta para desarrollar en el medio AEM.

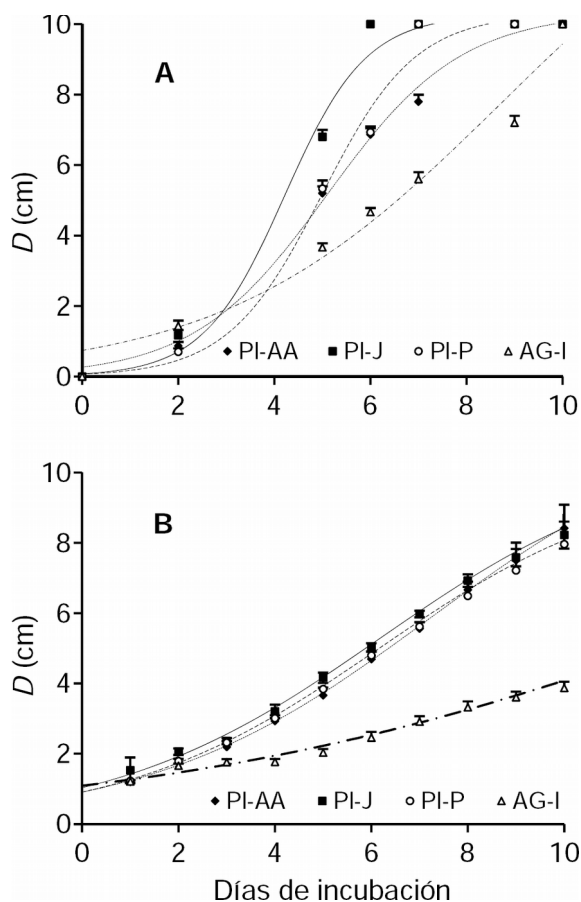


Figura 1. Desarrollo micelial de cepas de *P. ostreatus* (PI-J, PI-P y PI-AA) y *A. aegerita* (Ag-I). **A:** cultivadas en medio AEM; **B:** sobre orujo de pera con tratamiento enzimático previo (O+Ez). Se representan los valores medios y desvíos estándar del diámetro micelial de las colonias. Las líneas corresponden al ajuste de los datos experimentales mediante una función logística.

Figure 1. Mycelial growth of *P. ostreatus* (PI-J, PI-P y PI-AA) and *A. aegerita* (Ag-I) strains. **A:** cultured in medium AEM; **B:** in pear pomace with enzymatic pretreatment (O+Ez). Mean values and standard deviations of the mycelial colony diameter are shown. The lines correspond to the fit of the experimental data using a logistic function.

Luego de estudiar las curvas de crecimiento en medio AEM empleado como testigo, se analizó la capacidad de desarrollo micelial sobre orujo de pera (O+Ez) de las cepas, dada su aptitud para degradar diferentes sustratos lignocelulósicos (Philippoussis *et al.* 2001, Nyochembeng *et al.* 2008, Sánchez 2010, Rizki & Tamai 2011).

Según se observa en la Fig. 1B, el crecimiento micelial sobre el sustrato O+Ez evidenció mayores restricciones para el desarrollo de Ag-I cuyas colonias alcanzaron luego de 10 días de incubación un diámetro medio de sólo 4 cm mientras que las cepas de *P. ostreatus* lograron un diámetro de 8 cm luego en este tiempo, no evidenciándose diferencias significativas asociadas al tipo de cepa.

Sin embargo, el crecimiento sobre el sustrato O+Ez en comparación al desarrollo en medio AEM mostró un menor tiempo de latencia (Tabla 1).

En la fase de crecimiento exponencial sobre O+Ez, el análisis estadístico de los valores de v_{\max} no mostró diferencias significativas asociadas a las cepas de *P. ostreatus* analizadas, mientras que el valor obtenido para Ag-I resultó significativamente menor (Tabla 1). Con respecto al tiempo en alcanzar la v_{\max} se observó que las cepas de *P. ostreatus*, lograron alcanzar la v_{\max} luego de 6-7 días cuando desarrollaron sobre orujo de pera O+Ez. Cuando Ag-I desarrolló sobre O+Ez, el modelo logístico predijo un valor de t_{\max} superior a la duración de los ensayos (10 días), con lo cual el valor de v_{\max} fue estimado asumiendo validez del modelo para mayores tiempos de incubación.

Esto concuerda con lo observado por Nicolini *et al.* (1987) quienes informaron una mayor eficiencia de bioconversión de residuos industriales de naranja y uva para *P. ostreatus* con respecto a *A. aegerita*. Estudios realizados por Philippoussis *et al.* (2001) evidenciaron también que *P. ostreatus* coloniza más rápido y fructifica antes sobre paja de trigo y desechos de algodón en comparación con *A. aegerita*. Según estos autores, dicho comportamiento estaría asociado a los altos contenidos de lignina y a una baja relación celulosa:lignina de estos sustratos que ejercen un efecto negativo más marcado sobre el crecimiento y fructificación de *A. aegerita* que sobre *P. ostreatus*.

El desarrollo micelial sobre el sustrato O+Ez en comparación al medio AEM, evaluado en la fase de crecimiento exponencial, fue significativamente menor. Los valores de v_{\max} obtenidos sobre O+Ez evidenciaron una reducción del 30 al 50 % con respecto a los alcanzados en medio AEM (Tabla 1).

Las diferencias encontradas entre el desarrollo en medio AEM, empleado como testigo, y sobre orujo de pera estarían asociadas a la composición química de los mismos. El medio AEM posee características nutritivas que favorecen el crecimiento de la mayoría de hongos ya que proporciona los nutrientes como moléculas más simples, particularmente maltosa, glucosa, celobiosa y peptona. La importancia del carbono y por lo tanto de los carbohidratos, radica en que cerca de la mitad del peso seco de las células fúngicas es carbono. Las peptonas, productos que resultan de la digestión

de materiales proteicos, aportan nitrógeno amínico que constituye una fuente de nitrógeno orgánico para la mayoría de hongos (De León *et al.* 2012).

Efecto del tipo de orujo de pera sobre el crecimiento de cepas de *P. ostreatus*

Considerando que las industrias jugueras de la región del Valle Medio del Río Negro (Argentina) emplean tecnologías diferentes en la etapa de extracción de jugos, resultó de interés analizar la capacidad de crecimiento de cepas de *P. ostreatus* sobre los dos tipos de orujo (O+Ez y O) que se producen.

En esta etapa del trabajo se seleccionaron las cepas de *P. ostreatus* que, con respecto a la de *A. aegerita*, presentaron un mejor desarrollo sobre orujo de pera (Fig. 1B).

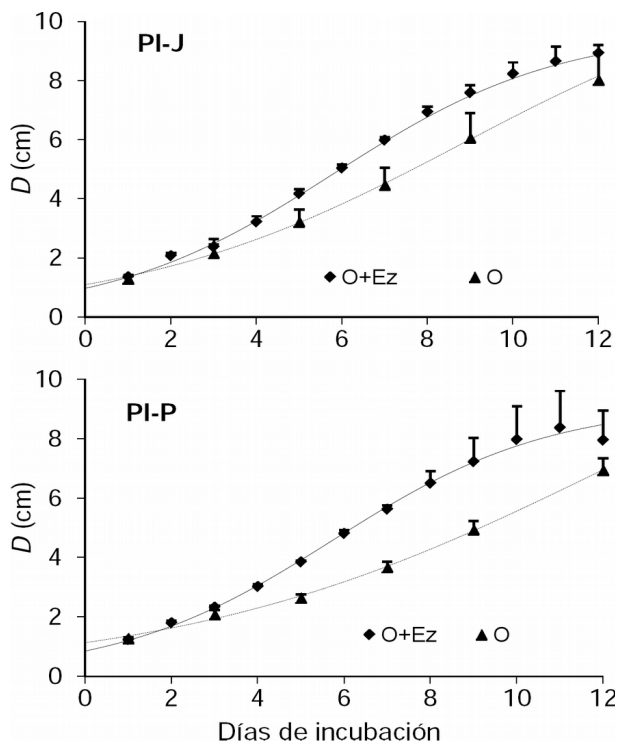


Figura 2. Desarrollo micelial de cepas de *P. ostreatus* PI-J (arriba) y PI-P (abajo) sobre orujos de pera con tratamiento enzimático previo (O+Ez) y sin pretratamiento enzimático (O). Se representan los valores medios y desvíos estándar del diámetro micelial de las colonias. Las líneas corresponden al ajuste de los datos experimentales mediante una función logística.

Figure 2. Mycelial growth of *P. ostreatus* strains PI-J (above) and PI-P (bottom) on pear pomace with enzymatic pretreatment (O+Ez) and without enzymatic pretreatment (O). Mean values and standard deviations of the mycelial colony diameter are shown. The lines correspond to the fit of the experimental data using a logistic function.

Según se muestra en la figura 2, el orujo con tratamiento enzimático previo al proceso de extracción de jugos (O+Ez) fue el más apropiado para el desarrollo de las cepas de *P. ostreatus* PI-J y PI-P, aunque durante el tiempo de incubación estudiado no alcanzaron a cubrir la caja completa. A los 12 días de desarrollo en O+Ez, el diámetro micelial medio para PI-J alcanzó un valor de 9 cm, mientras que para PI-P fue de 8 cm.

El análisis de los parámetros de crecimiento (Tabla 2) obtenidos a partir del ajuste logístico de las curvas de crecimiento indica que O+Ez es el sustrato más adecuado para permitir el desarrollo micelial, tanto en la fase de latencia (t_{lat}) como en la fase exponencial (t_{max} y v_{max}).

En la etapa de crecimiento exponencial, el valor de v_{max} resultó significativamente mayor para ambas cepas sobre O+Ez (0,94 cm/día y 0,93 cm/día) en comparación a O (0,77 cm/día y 0,71 cm/día).

El período en alcanzar la v_{max} fue de aproximadamente 6 días para PI-J y PI-P cuando el desarrollo micelial se evaluó sobre O+Ez y de unos 9 días para PI-J en el orujo sin pretratamiento enzimático (O).

Cuando PI-P desarrolló sobre O, el modelo logístico predijo un valor de t_{max} superior a la duración de los ensayos (12 días), con lo cual el valor de v_{max} fue estimado asumiendo validez del modelo para tiempos mayores.

Se evaluó además la composición química inicial (Tabla 3) de los sustratos empleados para el cultivo de *P. ostreatus* en ensayos de fermentación en fase sólida con el objeto de explicar las diferencias encontradas en las curvas de crecimiento micelial sobre dos tipos de orujos de pera produci-

Sustratos	C	N	LDA	Cel	pH	Cel	C
	% MS					LDA	N
O+Ez	56,48	0,970	17,67	36,97	4,5	2,09	58,22
O	56,73	0,704	22,09	30,76	3,9	2,57	80,65

Tabla 3: Composición química de los sustratos empleados para el cultivo de *P. ostreatus* y *A. aegerita* en ensayos de fermentación en fase sólida. O+Ez: orujo con tratamiento enzimático previo al proceso de extracción de jugos; O: orujo sin tratamiento enzimático; N: nitrógeno total; LDA: lignina en detergente ácido; Cel: celulosa; C: carbono orgánico.

Table 3: Chemical composition of the substrates used in assays of *P. ostreatus* and *A. aegerita* under solid state fermentation. O+Ez: pomace with enzymatic pretreatment; O: pomace without enzymatic treatment; N: total nitrogen; LDA: acid detergent lignin; Cel: cellulose; C: organic carbon.

dos por las industrias jugueras de la región (O+Ez y O).

El orujo con tratamiento enzimático previo (O+Ez) sería el más adecuado para permitir el desarrollo micelial de las cepas de *P. ostreatus* ensayadas ya que el contenido de nitrógeno total (0,97 %) y relación C/N (58,22) son los que más se aproximan a los informados como óptimos para las etapas de colonización del sustrato y fructificación (Tabla 3).

Diversos autores indican que para lograr elevados rendimientos en el cultivo de *Pleurotus* spp. el contenido de nitrógeno de los sustratos debería ser superior al 0,5 % y una relación C/N menor a 50 (Philippoussis *et al.* 2001, Nyochembeng *et al.* 2008, Sánchez *et al.* 2008, Rizki & Tamai 2011).

Nyochembeng *et al.* (2008) investigaron el crecimiento de hongos comestibles y la biodegradación de residuos de cultivos en vistas a lograr un ecosistema autosuficiente. Los resultados obtenidos evidenciaron que para el crecimiento micelial y fructificación óptimo de *L. edodes* y *P. ostreatus* se requieren cantidades significativas de nitrógeno, los cuales pueden ser inadecuados en algunos residuos de cultivos.

De un modo similar, Sánchez *et al.* (2008) y Rizki & Tamai (2011) en estudios sobre el rendimiento del cultivo de *P. ostreatus* empleando diferentes sustratos lignocelulósicos con niveles variables de nitrógeno observaron una concordancia entre la relación C/N y productividad.

Por su parte, Philippoussis *et al.* (2001) informaron que la velocidad de crecimiento micelial y la productividad del cultivo de diferentes cepas de *P. ostreatus* sobre residuos lignocelulósicos presenta correlación positiva con la relación C/N y celulosa/lignina, dado que la lignina es menos eficiente que la celulosa como fuente de Carbono. En este sentido, cabe destacar además que O+Ez presenta una menor relación Cel/LDA en comparación a O (2,09 y 2,57 respectivamente), lo que justificaría entonces la mejor aptitud de este tipo de orujo para permitir el desarrollo micelial.

El valor de pH medido en los orujos hidratados (4,5 y 3,9 para O+Ez y O, respectivamente) podría ser otro factor que permitiría explicar el mejor desarrollo de *P. ostreatus* sobre O+Ez ya que previamente hemos encontrado que en medio líquido los valores máximos de producción de biomasa micelial se obtienen a pH 5,5 (Barral *et al.* 2013).

La variación en la composición química de los

orujo analizados en este trabajo (O+Ez y O) podría estar relacionada con la digestión enzimática con pectinasas y celulasas (Ovando-Chacón & Waliszewski 2005) durante el proceso de extracción de jugos. Estas enzimas, al degradar los polisacáridos estructurales presentes en la pared celular de los vegetales, facilitan a los hongos la disponibilidad de nutrientes intracelulares y permitirían el mejor desarrollo sobre el orujo O+Ez de PI-P y PI-J, con respecto al orujo sin pretratamiento enzimático (O).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación, Desarrollo y Transferencia de Tecnología de la UNRN, Resolución 727/2012, PI 40-A-242 y por la Secretaría de Investigación de la UNCo, Resolución 750/11, PI 04/A107. Los autores agradecen a la empresa JUGOS S.A. por la provisión del orujo empleado en los ensayos.

Referencias

- Albertó E. 2014. Present and future: Searching for natural occurring strains for mushroom production. WSMBMP World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products Bulletin 10: 7-12. Disponible en http://wsmbmp.org/Bulletin_10_Content.html#como (accedido el 23-I-2015).
- Andrino A, Morte A & Honrubia M. 2011. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. Anales de Biología 33: 53-66.
- Balzarini MG, González L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA & Robledo CW. 2008. InfoStat, Manual del Usuario. Córdoba: Editorial Brujas.
- Barral G, Dobra A, Rodríguez GE & Agüero MS. 2013. Caracterización de parámetros de crecimiento de cepas del género *Pleurotus*. Characterization of growth parameters of *Pleurotus* strains. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 48 (Supl): 207.
- Bonatti M, Karnopp P, Soares HM & Furlan SA. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. Food Chemistry 88: 425-428.
- Cascio J, Woodside G & Mitchell P. 1997. Guía iso 14000: Las nuevas normas internacionales para la administración ambiental. México DF: McGraw-Hill.
- De León R, Lau D, Vallejo R & Klee C. 2012. Requerimientos fisiológicos que inciden en el crecimiento micelial y la degradación del sustrato por *Agrocybe aegerita*. En Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural (Sánchez JE & Mata G, eds.). Tapachula: Editorial El Colegio de la Frontera Sur Méxi-

- co, pp. 241-254.
- De Michelis A, Vullioud M & Rusalen R. 2009. Experiencias en el manejo de *Pleurotus ostreatus* (hongo de cultivo) para conservas. *Presencia* 54: 28-31.
- Frioni L. 1999. *Procesos Microbianos*. Río Cuarto: Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- FunBaPa. 2013. Informes estadísticos. Anuario Estadístico 2013 de egreso de peras y manzanas de la región protegida patagónica. Disponible en <http://www.funbapa.org.ar/wp-content/uploads/2014/03/ANUARIO-MANZANA-PERA-2013-ACTUALIZADO26.03.pdf> (accedido el 25-X-2014).
- Gaitán-Hernández, R. 2005. Evaluación *in vitro* del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología* 21: 77-84.
- Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL & Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversión and enzyme production (Review). *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 602-619.
- Horwitz W. 2002. *Official methods of analysis of AOAC International*. Gaithersburg, Md: AOAC International.
- Jasińska A, Siwulski M & Sobieralski K. 2012. Mycelium growth and yielding of black poplar mushroom-*Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. on different substrates. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2: 1040-1047.
- Karaman M, Jovin E, Malbaša R, Matavuly M & Popović M. 2010. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research* 10: 1473-1481.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J. 2004. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson-Prentice Hall.
- Merck. 2005. *Microbiology Manual*. Darmstadt: Merck KgaA.
- Nicolini L, von Hunolstein C & Carilli A. 1987. Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, and *Armillariella mellea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 95-98.
- Nyochembeng LM, Beyl CA & Pacumbaba RP. 2008. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. *Bioresource Technology* 99: 5645-5649.
- Ovando-Chacón SL & Waliszewski KN. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo* 21 (42): 111-120.
- Patil SS, Ahmed SA, Telang SM & Baig MMV. 2010. The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 7: 66-76.
- Philippoussis A, Zervakis G & Diamantoupoulo P. 2001. Bioconversión of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (2): 191-200.
- Pozzi MT, Filippín AJ, Matías C & Hammann A. 2010. Posibilidad de uso del alpechín en fertilización de tierras agrícolas. *Información Tecnológica* 21(4): 117-123.
- Rizki M & Tamai Y. 2011. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1695-1702.
- Royse DJ 2014. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)* 1: 1-6. World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products ICAR-Directorate of Mushroom Research. Mushroom Society of India. Disponible en <http://www.wsbmp.org/1/01.pdf> (accedido el 23-I-2015).
- Sánchez A, Ysunza F, Beltrán-García M & Esqueda M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2537-2542.
- Sánchez A, Esqueda M, Gaitán-Hernández R, Córdova A & Coronado ML. 2008. Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología* 28: 17-24.
- Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (6): 756-762.
- Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms (Mini-Review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (5): 1321-1337.
- Sarikaya A & Ladisch M. 1997. An unstructured mathematical model for growth of *Pleurotus ostreatus* on lignocellulosic material in solid-state fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (1): 71-85.
- ten Have R & Teunissen PJ. 2001. Oxidation mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi. *Chemical Reviews* 101: 3397-3413.
- Van Soest PJ, Robertson JB & Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Vega A & Franco H. 2013. Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. *Información Tecnológica* 24(1): 69-78.
- Zunino N. 2010. Cooperativa Agropecuaria de Hongos Comestibles Girpat. *Fruticultura & Diversificación* 62: 18-23.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM & van 't Riet, K. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1875-1881.