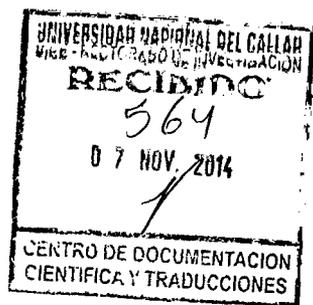




NOV 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y DE RECURSOS
NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN-FIARN



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL
CHAMPIÑÓN DE JARDINES PARA SU CULTIVO SOBRE GRAS
RESIDUAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO.

AUTOR: Blgo. CARLOS ODORICO TOME RAMOS
PERIODO DE EJECUCIÓN: Del 01/12/2011 al 30/11/2013
Resolución Rectoral de Aprobación N° 1356-2011-R

PERÚ-CALLAO-2013

DEDICATORIA:

A la memoria de mi madre Lucia que descansa en la gloria del todo poderoso y a mi Padre Odorico que me acompaña en vida, por inculcarme honestidad y perseverancia en el trabajo; a mi esposa Margarita por su apoyo constante y; a mis queridos Hijos: Jazmín, Carlos y Joaquín por la motivación en la búsqueda del éxito personal y profesional

I.- ÍNDICE

I.- ÍNDICE	1
II.- RESUMEN	4
III.- INTRODUCCIÓN.....	6
3.1 Planteamiento del Problema:.....	6
3.2 Importancia y Justificación:	7
IV.- MARCO TEORICO	9
4.1.- Importancia Ecológica de los Macromicetes	9
4.2.- Macromicetes Comestibles:	15
4.2.1.-Macromicetes Comestibles en el Perú	17
4.3.- Cultivo de Hongos Comestibles:	25
4.3.1.- Cultivo de Hongos Comestibles en el Perú.....	28
4.3.2.- Importancia comercial del cultivo de champiñones en el Perú:.....	34
4.4.- Fermentación líquida de Macromicetes:.....	37
4.4.1.- Fermentación Líquida del Género Agaricus:	39
4.5.- Macromicetes como Biorremediadores:	40
4.6.- Estudios sobre el <i>Agaricus campestris</i> :	42
4.6.1.-Características fenotípicas del <i>Agaricus campestris</i> :.....	42
4.6.2.- Aislamiento y Cultivo del <i>Agaricus campestris</i> :.....	45

4.7.- Identificación Molecular de Microorganismos:.....	45
4.7.1.- Identificación Molecular de Hongos:.....	46
4.7.2.- Identificación molecular de Agaricus:	49
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
5.1 Materiales:.....	50
5.2 Población	51
5.3 Técnicas e instrumentos de investigación.	51
5.4 Técnicas de análisis:.....	51
5.5 Metodología	52
5.5.1 Muestreo de ejemplares de hongos macroscópicos.....	52
5.5.2 Obtención de Cultivo puro de la seta muestreada	52
5.5.3 Propagación del Micelio.....	55
5.5.4 Producción de la semilla o blanco	55
5.5.5 Elaboración del pre compost a base del gras residual	56
5.5.6 Preparación del sustrato para la siembra de las semillas o blanco de la seta y evaluación del cultivo.	60
5.5.7 Identificación molecular de la seta	62
VI.- RESULTADOS	63

6.1 Del Muestreo:	63
6.2 Del Cultivo Puro de la seta muestreada	63
6.3 De la propagación del Micelio	64
6.4 De la Producción de la Semilla o Blanco	64
6.5 De la elaboración del Pre compost a base del gras residual	65
6.6 Del Cultivo de la seta hasta el Fructificado:	67
6.6.1 Primera experiencia sobre el cultivo de la seta:	67
6.6.2 Segunda experiencia sobre el cultivo de las setas:	68
6.6.3 Tercera experiencia sobre el cultivo de las setas:	69
6.6.4 Cuarta experiencia sobre el cultivo de las setas:	70
6.7 De la Identificación a nivel molecular	72
VII.- DISCUSIÓN	73
VIII.- REFERENCIALES	79
IX.- APÉNDICE	85
X.- ANEXOS	104

II.- RESUMEN

La seta comestible *Agaricus campestris* crece de forma natural en el césped de las áreas verdes o suelos de cultivo de Lima y Callao, por ello en el presente trabajo de acuerdo a los objetivos planteados se aisló una cepa sobre el agar Sabouraud glucosado modificado con extracto del gras residual, se proliferó para obtener el blanco o semilla sobre trigo o cebada y luego se sembró sobre un sustrato a base de los residuos de la poda del césped de los jardines de la Universidad Nacional del Callao y cultivado bajo condiciones ambientales del laboratorio de Microbiología de la FIARN/UNAC y, con el apoyo del laboratorio de Biología y Genética Molecular de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se realizó la identificación a nivel molecular de la cepa aislada. Del cultivo sobre los sustratos a base del gras residual se realizaron en cuatro oportunidades, en las cuales sólo se logró la invasión del micelio pero no el fructificado del hongo y; en relación a la identificación, por las características fenotípicas y el Análisis filogenético de la secuencia 5,8S ribosómico corresponde a la especie *Agaricus campestris* con un 99.9% de identidad para la secuencia analizada.

La cepa de hongo aislado e identificado molecularmente como *Agaricus campestris* se desarrolla sobre sustratos a base del gras residual de las áreas verdes de la Universidad Nacional del Callao bajo condiciones ambientales del laboratorio de Microbiología de la facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales pero sin llegar al fructificado del mismo.

Palabras Claves: Setas, cepas, micelios, fructificado de setas, sustratos.

ABSTRAC

The eatable mushroom *Agaricus campestris* grows naturally in the lawn of the green areas or farming's land of Lima and Callao, so in the following work according to the objectives, the strain was isolated on the glycoside Sabouraud agar modified with extract of the residual grass, it was proliferated in order to obtain the white or seed of wheat or barley; and then they were planted over a substratum based on the residues of the pruning of the garden's lawn of the National University of Callao. They were cultivated low environmental conditions of the Microbiology's laboratory of the FIARN/UNAC and, with the support of the Biology and Molecular Genetics' laboratory of the college Medicine Veterinary of the National University of San Marcos; it was accomplished the identification in a molecular level of the isolated strain. Of the crops of substratum based on the residual grass were realized in four opportunities, in which only the invasion of the mycelium were accomplished but not the mushroom's bear fruit and; in relation with the identification, according to the phenotypical characteristics and the analysis phylogenetic of the consequence 5,8S ribosomal, it corresponds with the specie *Agaricus campestris* with a 99,9% of identity for the sequence analyzed.

The isolated and identified molecularly as *Agaricus campestris*, mushroom's strain, is developed on substratum based on residual grass of the green areas of the National University of Callao low environmental conditions of the Microbiology's laboratory of the college Environmental Engineering and Natural Resources but without the accomplishment of the bear fruit of the mentioned strain or mushroom.

Key Words: Mushroom, strain, mycelium, strain's bear fruit, substratum.

III.- INTRODUCCIÓN

3.1 Planteamiento del Problema:

El problema mundial sobre el cambio climático es una preocupación de toda la población humana, y bajo éste contexto a nivel de los gobiernos locales y/o regionales del Perú, se han optado por ampliar y/o recuperar las áreas verdes en las ciudades, sea como mejora de la estética del paisaje o como fijadores naturales de carbono (captura de gases de efecto invernadero). Sin embargo, éstas áreas verdes deben ser podadas periódicamente y ello genera también grandes cantidades de residuos orgánicos que; en el mejor de los casos son dispuestas en los rellenos sanitarios con un costo económico para los ciudadanos y/o simplemente son incineradas a campo abierto ocasionando una contaminación atmosférica con los gases de efecto invernadero (CO, CO₂, etc.). Por ejemplo, en un informe del distrito de Ate –Vitarte sobre su disposición final de malezas en el relleno sanitario de Huayco loro desde enero al 20 de Octubre del 2006 le generó un gasto de S/.17 633.88 nuevos soles (37).

La Dra. Magdalena Pavlich Herrera en el 2001 (22), en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, reporta a *Agaricus campestris* como un hongo comestible de hábitat natural del césped abonado de jardines de Lima y; en el verano del año 2009 se observó el crecimiento de unas setas con características descritas correspondientes a *Agaricus campestris* sobre un suelo, que agregaron previamente dos semanas antes residuos de la poda de césped de un jardín de la zona como abono verde, después del riego por inundación en un biohuerto ubicado en el Centro Poblado Mayor de Santa María de Huachipa – Lurigancho.

Objetivos: Con el objetivo de brindar un uso alternativo de los residuos orgánicos de las áreas verdes de las ciudades, específicamente el residuo de la poda del césped de

los jardines, es que se busca aislar una cepa de la seta correspondiente a la descripción de *Agaricus campestris* para su cultivo sobre sustratos a base del gras residual de la poda de los céspedes y, lograr su identificación a nivel molecular. Se evaluará el cultivo sobre diferentes sustratos de pre compost elaborados en base al gras residual en condiciones ambientales adecuadas en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao, localizado en el Distrito de Bellavista de la Provincia Constitucional del Callao.

3.2 Importancia y Justificación:

Es una investigación de tipo experimental que corresponde a la ciencia aplicada, cuyo resultado beneficiará a la comunidad universitaria de la Universidad Nacional del Callao, a los gobiernos locales y/o regionales y en general a toda la sociedad peruana, considerando que va a permitir el uso de un residuo orgánico residual, para obtener un alimento nutritivo, que podría ser parte de la dieta alimenticia de los alumnos del comedor universitario y además ser aprovechada por el centro de producción de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales con beneficios económicos. Así mismo, se podría aplicar esta tecnología limpia a nivel de autoridades locales o a nivel de la región Callao en primera instancia, para contribuir con una fuente nutritiva y fomentar el desarrollo sustentable de los ecosistemas urbanos; beneficiando además con una alternativa de trabajo para la sociedad en general.

Aislar y tener ceparios de un hongo comestible, identificado molecularmente y que, crece óptimamente sobre un sustrato a base de residuos de la poda del césped de los jardines, sería un aporte de la Universidad Nacional del Callao, como un recurso natural disponible para todas aquellas personas y/o entidades que cultivan y/o desean dedicarse al cultivo de hongos comestible como una actividad económica. Por otro lado, en el tema de biorremediación de suelos contaminados, los hongos por su

naturaleza metabólica de ser heterótrofos pueden ser utilizados como biorremediadores, en tal sentido, la seta aislada sería un organismo que podría ser utilizada en el tratamiento oxidativo de suelos contaminados con sustancias orgánicas tales como petróleo y/o sus derivados, así como también para adsorber ciertos metales pesados.

Conocer la tecnología apropiada para el cultivo de una seta sobre un residuo orgánico, específicamente sobre el residuo de la poda de los céspedes de los jardines, permitiría cumplir una de las funciones de la Universidad Nacional del Callao, que es la de crear ciencia y tecnología para la sociedad del Callao y de todo el Perú. La Universidad Nacional del Callao podría generar sus recursos económicos propios a través de la realización de cursos de capacitación para todos los interesados en dicha actividad. Los gobiernos locales y/o regionales tendrían una alternativa de uso de un residuo que en la actualidad le está significando un gasto económico para su disposición final; además les permitiría fomentar una alternativa de trabajo con beneficios económicos y sociales para nuestro medio, aprovechando un recurso residual y a la vez contribuyendo con la conservación del ecosistema urbano.

IV.- MARCO TEORICO

Los hongos son microorganismos eucariotas, portadores de esporas, con nutrición de absorción, carentes de clorofila, que se reproducen de forma asexual y sexual y; tienen gran importancia para los seres humanos, sea positiva (beneficiosas) o negativamente (perjudiciales) que se desarrollan de forma natural en hábitats de suelo, agua y también se les encuentra en el aire generalmente en su estado de esporas, y participan en la degradación de la materia orgánica compleja del ambiente a compuestos orgánicos simples y moléculas inorgánicas, dejando a disposición para otros organismos: C, N, P, y otros componentes cruciales a partir de los organismos muertos.

Se les encuentra como pluricelulares (mohos) o como unicelulares (levaduras) y según su tamaño existen los microscópicos y los macroscópicos y; en el presente trabajo nos dedicaremos a tratar sobre las setas macroscópicas, y muy especialmente del *Agaricus campestris* desde la perspectiva de su importancia para los ecosistemas terrestres y de su utilidad como hongos comestibles y los avances en su cultivo con fines de producción comercial.

4.1.-Importancia Ecológica de los Macromicetes

Martínez Peña, Fernando en el 2008 (18), en su tesis doctoral registró 45 taxones comestibles con una producción media de $51,5 \pm 8,9$ kg/ha. Las especies de mayor interés socioeconómico fueron *Boletus edulis* con $40,3 \pm 12,2$ kg/ha y *Lactarius deliciosus* con $9,9 \pm 3,5$ kg/ha. El estudio ha sido realizado en el DIF Valonsadero de la Junta de Castilla y León, en el marco del Proyecto RTA03-046 “Estudio para la ordenación del recurso micológico en masas de *Pinus sylvestris*L”. Además, de la parte introductoria de la tesis se puede rescatar para el presente trabajo la importancia de los hongos en un ecosistema:

“La mayoría de los taxones pertenecientes a los macromicetes corresponden a las divisiones Basidiomycota y Ascomycota. En cuanto a su función ecológica, hoy es ampliamente reconocido que los hongos desempeñan un papel esencial para el funcionamiento del ecosistema (Trappe y Luoma,1992). Dicho papel está ligado en gran medida a sus características tróficas. Así los hongos se dividen en los siguientes grupos tróficos según sus preferencias de nicho-substrato: simbioses, saprobios y parásitos (Arnolds, 1988).

Hongos Simbioses: Los hongos simbioses se dividen en liquenizados y micorrízicos. Los primeros, que no se tendrán en cuenta en este estudio, forman asociaciones simbióticas con algas y se comportan como unidades estructurales y funcionales independientes. Los hongos micorrízicos establecen asociaciones simbióticas mutualistas con las plantas, formando las denominadas micorrizas, término empleado por primera vez por Frank (1885), para definir la asociación simbiótica entre las hifas de un hongo y las raíces de una planta. Esta asociación ha resultado ser de gran importancia, debido al papel que desempeñan, tanto en ecosistemas naturales, como en los sistemas biológicos creados por el hombre. La evolución de las micorrizas ha tenido un fuerte impacto en los ecosistemas terrestres. Price (1991), sugiere que las asociaciones micorrízicas son los derivados estables de interacciones antagonistas ancestrales, entre plantas y hongos parásitos. Registros fósiles de hace 400 millones de años apuntan a que las micorrizas facilitaron la colonización del medio terrestre por las plantas (Malloch et al., 1980).

Se estima que entre el 85% (Hawksworth et al., 1995) y el 95% (Trappe, 1977; Trappe, 1987) de las especies de plantas vasculares, actualmente conocidas en el mundo, pertenecen a familias característicamente micorrízicas. Sin embargo, sólo del 3 al 5% de dichas plantas establecen asociaciones de tipo ectomicorrízico (Meyer, 1973; Trappe, 1977). A pesar de ello, su importancia en el mundo forestal es enorme, pues se trata de las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, etc. Además, se percibe una graduación en la dependencia de la planta respecto a su simbiote fúngico, existiendo géneros obligadamente ectomicorrízico como Pinus, Fagus,

Larix Picea (Meyer, 1973; Álvarez, 1991).

Por otra parte, los hongos formadores de ectomicorrizas (ECM) se encuentran principalmente entre las clases Basidiomycetes (Amanita, Boletus, Lactarius, Hebeloma, etc.) y Ascomycetes (Elaphomyces, Tuber, Balsamia, etc.), e incluyen muchas de las especies comunes en nuestros bosques (Trappe, 1962). Los carpóforos de algunas de estas especies fúngicas tienen gran interés económico, por ser muy apreciados para el consumo humano, como las trufas, boletos, niscalos, criadillas de tierra, entre otros. Las ectomicorrizas pueden reconocerse por la presencia de una cubierta fúngica llamada manto que envuelve a la raíz, originando diferentes formas estructurales. El micelio fúngico penetra intercelularmente en el córtex radical para formar un entramado de hifas que recibe el nombre de red de Hartig. Es en esta zona donde se produce el intercambio de nutrientes y agua entre el hongo y la planta. Los hongos ectomicorrízico favorecen principalmente la captación de fósforo y nitrógeno (Read, 1992; Brandes et al., 1998). Las hifas del hongo absorben el agua y nutrientes del suelo, y los transportan al manto donde se metabolizan y almacenan. Posteriormente, el sistema de hifas de la red de Hartig transfiere dichos nutrientes a la planta hospedante a cambio de carbohidratos. Las ectomicorrizas intervienen directamente en las relaciones de competencia que se establecen entre las plantas por la captación de nutrientes y agua. Por un lado, son capaces de movilizar y traslocar al vegetal elementos nutritivos que de otra forma le serían inaccesibles y, por otro, a través de los cordones miceliares y los rizomorfos de las micorrizas se puede producir una transferencia de elementos minerales entre árboles vecinos (Brownlee et al., 1983). Esta interconexión subterránea a través del simbiote fúngico actuaría como un factor equilibrador del ecosistema.

La aplicación forestal de las ectomicorrizas puede estar dirigida hacia dos objetivos: producción de planta micorrizada para la forestación de zonas problemáticas y producción de planta forestal micorrizada con especies fúngicas de valor comercial (*Lactarius deliciosus*, *Boletus edulis* o *Tuber melanosporum*), cuyo principal objetivo sea la fructificación del hongo. Esto último está muy desarrollado en especies del

género *Tuber*, de las que actualmente ya existen plantaciones privadas en plena producción, en países como España, Francia o Italia.

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VAM) son las más frecuentes, ampliamente distribuidas y muy ubicuistas (Hawksworth et al., 1995). Son especialmente comunes entre las plantas de cultivo, herbáceas, arbustos, especies tropicales y también algunos árboles de la zona templada. Los hongos formadores de este tipo de micorrizas pertenecen al Orden Glomales y no producen cambios en la estructura externa de la raíz. Las hifas del hongo penetran en el córtex, formando vesículas y estructuras arbusculares intracelulares muy características.

Las micorrizas ericoides aparecen en plantas del Orden Ericales asociadas principalmente a la División Ascomycota. Se caracterizan por la existencia de hifas intracelulares en forma de tirabuzón. Son muy efectivas en la absorción del nitrógeno y aumentan la tolerancia de las plantas a la toxicidad por metales pesados (Raven et al., 1986).

Las micorrizas arbutoides son exclusivas de algunos géneros del Orden Ericales (*Arbutus* y *Arctostaphylos*), asociados tanto a la División Basidiomycota como Ascomycota. Las hifas forman tirabuzones en el interior de las células corticales, pero también aparecen en los espacios intercelulares a modo de red de Hartig. Además forman un manto fino que hipertrofia la raíz.

Las micorrizas monotropoides son características de la familia Monotropaceae. Estas son plantas aclorofilicas, dependen exclusivamente de los hongos, principalmente Basidiomicetes, para el suministro de carbohidratos, procedentes de otras plantas autótrofas del entorno, con las que éstos establecen asociaciones o bien de su propia actividad saprobica (Cooke, 1977; Harley y Smith, 1983). Por último, las micorrizas orquidoides, son características de las orquídeas y de algunos Basidiomicetes.

Los entramados miceliarios que se extienden por los horizontes superficiales del suelo mejoran las condiciones estructurales de éste y por tanto su productividad (Molina y Amaranthus, 1991). Además, la estabilidad y resistencia de un ecosistema ante

cualquier perturbación podría aumentar manteniendo una diversidad fúngica alta. Las distintas especies realizan un gran número de funciones ecológicas que, en conjunto, mejoraría la capacidad de recuperación de dicho ecosistema (SarrionandiaAreitio, 2006).

Hongos Saprobios: Los hongos saprobios se nutren de sustancias producidas por la descomposición de la materia orgánica muerta. Este proceso conlleva la volatilización del C, H y O y la liberación de N, P, K, S entre otros elementos. Junto con las bacterias, estos hongos están involucrados en el reciclaje de la materia orgánica. Para ello se han dotado de eficientes complejos enzimáticos, capaces de degradar fuentes de carbono complejas como la celulosa, la lignina o el almidón y transformarlas en moléculas sencillas y nutritivas como azúcares y aminoácidos. Estos enzimas presentan distinto grado de efectividad en la degradación de los sustratos, condicionando la mayor o menor especialización de estos hongos. Mientras algunos hongos aprovechan indistintamente materia orgánica de origen diverso, otros prefieren sustratos más específicos. Así encontramos hongos saprobios humícolas, coprófilos, lignícolas, entre otros. La descomposición es un proceso largo, dependiente de factores como el tamaño del resto, clima, humedad del sustrato, contenido de sustancias tóxicas, etc. Los grandes troncos pueden requerir más de 300 años, mientras que las pequeñas ramas entre 2 y 20 años (Rayner y Boddy, 1988). La mineralización de la materia orgánica no siempre es completa, pudiéndose acumular en el suelo. Los hongos saprobios no sólo mineralizan las sustancias orgánicas, también retienen gran cantidad de nutrientes en el micelio, que se van liberando de forma gradual, facilitando su utilización posterior por parte de las plantas (Boddy y Watkinson, 1995). Dada la gran cantidad de biomasa vegetal que cada año cae al suelo, podemos imaginar que sin la actividad de los hongos saprobios, dicha biomasa se acumularía y colapsaría el funcionamiento del ecosistema.

En lo que a producción de carpóforos se refiere, diversos autores señalan que la proporción de saprobios respecto del total de macromicetes es generalmente baja

(Vogt et al., 1992), aunque esto depende de la cantidad de restos que se acumulen en el bosque. La importancia económica de los hongos saprobios comestibles no es despreciable. Especies como *Agaricusbisporus* "champiñón", *Pleurotustreatus* "seta de chopo", *Pleurotuseryngii* "seta de cardo" se encuentran, por su apreciada calidad gastronómica, entre las más consumidas y comercializadas en España. El cultivo industrial de hongos saprobios comestibles se ha conseguido con algunas especies. Resulta necesario el control de ciertas condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, la aireación y el fotoperiodo, con necesidades diferentes en función del grado de desarrollo del carpóforo. La elección de un sustrato adecuado al equipamiento enzimático de cada especie y que responda a ciertas condiciones estructurales, es imprescindible para el éxito de la producción (Delmas, 1989).

Hongos Parásitos: Estos hongos se caracterizan por vivir en diferentes huéspedes, a los que provocan daños más o menos graves o incluso la muerte. En el caso de provocar una enfermedad en el hospedante hablamos de patógenos. Se dividen en biotróficos cuando una vez que matan al hospedante desaparecen y necrotrofos cuando continúan degradando de forma saprobia al hospedante una vez muerto. Un ejemplo de parásito, que afecta tanto a bosques de coníferas como de frondosas, es *Armillariamellea*. En este caso, la infección de las plantas sanas produce normalmente en los puntos de contacto de sus raíces con otras raíces enfermas o mediante los propios rizomorfos de dicho hongo. Los hongos parásitos juegan un papel importante en el ecosistema, afectando a la competencia entre especies vegetales, y actuando, en general, como factores equilibradores del ecosistema. Así, pueden abrir huecos en el bosque, creando microhábitats y favoreciendo el establecimiento de otras especies, provocando cambios en el tamaño y distribución de la población vegetal y aumentando la diversidad (Dickman, 1992). Sin embargo, en bosques mono específicos y particularmente en plantaciones con especies alóctonas, los hongos parásitos pueden ocasionar graves daños en las masas forestales. El parasitismo también puede producirse entre dos hongos, como ocurre con *Peckii lateritia* que parasita el himenio de los nísalos (*Lactariusdeliciosus*)

provocando generalmente la desaparición de las laminillas, razón por la cual los ejemplares afectados reciben el nombre de “niscalos machos”. Otro ejemplo es *Sepedoniumchrysospermum* que parasita a *Boletusedulis*. El parasitismo de unos hongos sobre otros responde a la existencia de un control biológico natural. Así, graves enfermedades de micoparásitos, como *Heterobasidionannosum*, pueden ser controladas mediante la aplicación de otros hongos antagonistas como *Peniophoragigantea*(Lumsden, 1992).”

4.2.- Macromicetes Comestibles:

Existe una diversidad de hongos macroscópicos con propiedades nutritivas y/o medicinales utilizadas por la población humana, de las cuales muchas son consumidas por recolección de la naturaleza, es decir no son cultivadas sino recolectadas de ciertos bosques; para ser utilizadas como alimento y satisfacer las necesidades nutritivas de ciertas comunidades.

Flores Arzú, R. y otros en el 2012 (12) presentan una lista preliminar de macrohongos de Guatemala, con notas sobre su comestibilidad y conocimientos tradicionales:

“Ofrecemos una lista de control basado en la literatura previa de los macrohongos que ocurre en diferentes regiones ecológicas de Guatemala, complementadas con observaciones originales presentado aquí por primera vez. Trescientos cincuenta especies, 163 géneros y 20 órdenes de Ascomycota y Basidiomycota se han registrado en Guatemala. Muchas de las cuales corresponden a especies ectomicorrícico de hongos que viven en simbiosis con el Pinus y varias especies de Quercus que forman el extenso bosque de pino y bosques mixtos de las tierras altas (hasta 3600 msnm).”

México es uno de los países que ha avanzado significativamente en el estudio sobre los hongos comestibles, sin embargo muchos de sus investigadores consideran que el conocimiento científico es aún insuficiente. De las memorias del XI Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales realizado el 5, 6 y

7 de junio del 2012 en Mazatlán, Sinaloa, México; se puede apreciar sobre los avances en estudios científicos sobre los hongos comestibles en dicho país. Burrola Aguilar, Cristina y, otros en el 2012 (3) realizaron un estudio sobre el conocimiento tradicional en el aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en México y llegan a la siguiente conclusión:

“Los hongos comestibles silvestres pueden representar una alternativa real en el manejo de los bosques, ya que son un recurso forestal no maderable que constituye una fuente económica y productiva para las comunidades rurales que habitan las regiones boscosas. Esta información permite el desarrollo de mecanismos para el aprovechamiento y la información vertida en el presente puede ser el punto de partida para el uso sustentable de este recurso”.

Quiñónez Martínez, Miroslava y otros en el 2012 (25) en el Instituto de Ciencias Biomédicas-Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Facultad de Zootecnia-Universidad Autónoma de Chihuahua, Instituto Tecnológico de Ciudad Juárez; sobre el conocimiento científico actual de los hongos macromicetos de los bosques de Chihuahua concluye:

“La riqueza actual conocida de especies de hongos macromicetos contrasta con la escasez de su conocimiento científico. Por ello, es importante incrementar sus estudios y adicionar elementos ecológicos y aspectos étnicos que permitan ampliar su conocimiento actual.”

Erika Manzanilla y Juan Vichi en el 2012 (16) realizaron un estudio sobre biodiversidad de hongos macroscópicos de la universidad de Quintana Roo, campus Chetumal y concluyen:

“La diversidad y abundancia de hongos macroscópicos en el lugar de estudio es amplia, a pesar de que éste se realizó en una temporada seca. Este trabajo contribuye con el conocimiento de la biodiversidad de especies del campus Chetumal de la Universidad de Quintana Roo, especialmente al acervo genético vivo con el que cuenta. Cabe mencionar que ya se tiene registrado un sendero interpretativo con

especies endémicas y una colección ficológica con fines didácticos y de investigación.”

4.2.1.-Macromicetes Comestibles en el Perú

El consumo de macromicetes en el Perú es poco difundido, aunque actualmente gracias a la promoción de la actividad turística se le está dando cada vez mayor importancia en la dieta de la población peruana; al respecto Talledo Rodríguez, Gaby en 1998 (36) hizo una reseña sobre la situación histórica del consumo de hongos y setas comestibles en el antiguo Perú:

“El consumo de hongos no es muy difundido en nuestro país; pero no es ajeno a nuestra realidad y pasado. Según Ravines (1 991) nos comenta que se han encontrado representaciones iconográficas de hongos en las antiguas culturas del Perú. Algunos motivos pictóricos, presentes en vajillas del estilo moche IV, como el ilustrado, podrían sugerir la representación de hongos dado en el contexto que aparecen. Por otra parte, en este caso, la evidencia etnográfica adquiere especial connotación. Es significativo el consumo actual de ciertas especies de hongos que hace la población indígena del sur del Perú, particularmente de los departamentos de Cusco, Puno y de la Paz (Bolivia). Su uso como producto alimenticio, podría tomarse como la supervivencia de un antiguo patrón hispánico de la región.

Los términos callampa, concha, paco, como equivalentes de hongos, figuran ya en los primeros vocabularios de la lengua general del Perú o quechua. Fray Domingo de Santo Tomás en sus léxicas o Vocabulario de la lengua general del Perú, (Valladolid 1 560) registran los siguientes vocablos:

- Hongo de Prado- Chocpa, o callampa, o paco, o concha.
- Callampa o Callaba- hongo o seta.
- Chopa, o callampa, o paco o concha-hongo.

En el mercado “La Rodríguez” de la Paz Bolivia en 1 930, se identificaron como:

Agaricussingen, hongos de dimensiones muy variables, de pedicelo ligeramente cilíndrica y sombrero de color blanquecino en la parte superior y marrón oscuro en la inferior, que brotan espontáneamente en las punas en medio de los pajonales y adquieren su mayor desarrollo de Octubre a Diciembre.

Según Fortunato L. Herrera, quien aparentemente en 1930 registró la misma especie en el Cusco, el Agaricussingen o Agaricuscampestris; es un alimento muy agradable que se emplea en diversos potajes. Lo expenden vendedores ambulantes, embalados en haces de paja, como artículo de primera necesidad. Se conserva por largo tiempo haciéndolos secar al aire libre y a la sombra, suspendiéndole en hilos.

No sólo en el sur del Perú se ha identificado hongos. Door, 1990, identificó 14 especies de hongos comestibles, en la selva de Huánuco, que en su totalidad 8 pertenecen al orden de los agaricales, cuatro al orden aphylophorales y dos al orden tremellades. Todas estas especies fueron encontradas sobre madera en descomposición; ya sea en montones de aserrín en los aserraderos como el caso de: Collybiadryophila, Pluteoscervinus, y Volvariellabakeri o sobre troncos caídos en el bosque como las especies Auriculariafuscosuccinea, Favolusalveolavis, Favolusbrasiliensis, Pleorotusostreatus, Pleorotusroseopileatus, Pleorotusconcavus, Panusconchatus, Polypurussanguineus, Schizophyllumcommune.

Del total de especies identificados sólo aparecen Auriculariadelicata, Auriculariafuscosuccinea, Pleorotusostreatus y Volvariellabakeri. Se cultiva a escala comercial en diferentes países del mundo como: China, Japón, Filipinas, EE. UU. Y México. Estos hongos poseen buenas cualidades culinarias y crecen en gran cantidad de sustratos a pesar de ser naturalmente lignícolas. Las especies restantes no se cultivan, sólo se colectan, no gozan de tanta fama como las anteriores.

De una encuesta realizada sobre el consumo de hongos en Huánuco se determinó que del total de personas encuestadas el 44% utilizan los hongos comestibles como alimento y esto lo aprendieron de sus ancestros; siendo los pobladores provenientes

de la sierra, los habitantes de las zonas rurales y los que se dedican a la actividad agrícola como ocupación principal, los mayores consumidores con 64.55 y 82 % respectivamente. Así mismo, el 80 % de la muestra de colonos forestales, el 40% de la muestra de pobladores de la zona de Pachitea y el 20 % de la muestra de pobladores de la comunidad Shipiba, consumen hongos. Como es evidente existe un gran potencial de consumo de estos alimentos del bosque entre los pobladores de la zona, principalmente entre los colonos forestales que los utilizan como alimento aunque en forma muy eventual.

Se apreció un desconocimiento casi total de que los hongos silvestres comestibles pueden cultivarse, que poseen un alto valor comercial y que podrían constituirse en una fuente importante de ingresos en caso de ser cultivados y comercializados.

También podemos precisar que en la zona de la selva de Cajamarca y en el Departamento de Ancash, en las cercanías del callejón de Huaylas, se recolecta un hongo micorrízicos, difícil de aislar, el *Boletus sp.* ; el cual después de ser cosechado, es secado al sol, se envasa en presentaciones de 5, 10 y 100 g y se vende sólo o con hojas de laurel, es el conocido como “**Hongos con Laurel**”, que se utilizan en salsas, guisos, etc., el cual tiene un alto valor económico, y es exportado a Chile. Este hongo aparece en el otoño o después de las lluvias.”

Pavlich Herrera, Magdalena en el 2001(22); hace un estudio sobre los hongos comestibles del Perú y se resume en:

“El presente trabajo comprende el estudio de 22 especies nativas peruanas de hongos comestibles y/o medicinales; de éstos, 20 pertenecen a la clase de Basidiomycetes comprendidos en los ordenes AGARICALES, TREMELLALES y APHYLLOPHORALES y una especie al orden PEZIZALES de la clase Ascomycetes. Este estudio se ha realizado en colecta en varios departamentos del país. Al momento estamos cultivando especies nativas de los géneros Pleorotus, Auricularia, Pleurocollybia y Ganoderma. Es importante además de conocerlos,

difundir sus cualidades gastronómicas, su contenido proteico y de vitaminas, así como sus propiedades medicinales, si es que las tienen.”

En ciertas comunidades alto andinas del Perú, que se aventuraron al proyecto de reforestación con pino, actualmente están aprovechando de los hongos comestibles que se desarrollan de forma natural en los bosques, mejorando la calidad de vida de dichas comunidades y logrando establecer una línea económica sostenible, al respecto tenemos la historia de la comunidad campesina de Marayhuacadel 2013 (6):

“La comunidad campesina San Isidro Labrador de Marayhuaca es un caserío ubicado en el distrito de Incahuasi, sierra de Lambayeque-Perú, a más de 3,500 msnm. La única vía de acceso es una trocha bastante accidentada debido a los huaicos generados por las constantes lluvias, y dista de la ciudad de Chiclayo unas 8 horas. Los habitantes de esta comunidad se dedicaron por mucho tiempo a una ganadería y agricultura menor que sólo les abastece para su consumo. Las transacciones comerciales se realizaban a través de trueques, por no haber actividades que son remuneradas en la zona. Para poder obtener ingresos que sostengan a sus familias, migraban a la costa, en la mayoría de los casos sólo el 8% de la población que tenía posibilidades, quedando el resto con la única alternativa de consumir, para su sustento diario, lo poco que las parcelas sin ningún manejo producían. Las pocas personas que migraban a la costa, no tenían posibilidades de competir por la falta de preparación en la búsqueda de un trabajo digno que les permitiera subsistir. El desarrollo de esta comunidad del distrito de Incahuasi fue gracias al apoyo de Agro Rural (anteriormente, Programa Nacional de Manejo de Cuencas Hidrográficas y Conservación de Suelos PRONAMACHCS, perteneciente al Ministerio de Agricultura), a cargo del Ing. Bernardino Lalopu Silva, por el cual desde 1995 se llevó a cabo un programa destinado a la forestación de pinos. En la actualidad, cuenta con 800,000 árboles que permiten proteger de las corrientes de frío que azotan la zona y dan protección al medio ambiente, generando un ecosistema propicio para otros cultivos. Hasta ese momento, se tenía proyectado la cosecha de madera de pino en 20

años, con el tiempo y gracias a un milagro de la naturaleza aparecieron una variedad de hongos comestibles junto a los pinos, producto de una simbiosis natural. Inicialmente, los pobladores creían que eran malezas y no les dieron importancia, sin embargo, el Ing. Bernardino Lalopu Silva (Jefe de Agencia Incahuasi, PRONAMACHCS, hoy AGRORURAL) le prestó mucho interés, por lo que decidió investigar al respecto. Al conocer que uno de estos hongos era comestible y que presentaba cualidades organolépticas (caracterizada por sabor, textura, olor y color, que producen al comer una sensación agradable), así como su alto valor nutritivo con un 22% de proteínas y valor medicinal, poco a poco se convirtió el hongo comestible de Marayhuaca en un insumo altamente apreciado, considerado una “carne” 100% “vegetal” y ecológica, ideal para ser incluida en una dieta diaria sana para personas de toda edad.”

En anexos se presenta los valores nutritivos del hongo de Marayhuaca (véase en anexos la figura N° 4.1, en la página: 109)

En el diario “El Comercio” el 17 de Enero de 2008 (7), se publica un artículo sobre la comercialización de hongos comestibles por la comunidad campesina de Marayhuaca:

“El afán por sacar de la extrema pobreza a su pueblo hizo que Eleuterio Sánchez impulsara la comercialización del hongo micorrízicos de la especie *'Suillusluteus'* que crece al costado en un bosque de 500 hectáreas de pinos, en la localidad alto andina de Incahuasi (Ferreñafe), a unos 3.500 metros sobre el nivel del mar.”

La comunidad campesina de Marayhuaca, no es la única comunidad que ha experimentado sobre la comercialización de los hongos comestibles, por ello la agencia peruana de noticias Andina el 3 de Julio del 2009(1) publica:

“Más de 340 familias de campesinos de la Granja Porcón, en Cajamarca, y de San Isidro Labrador de Marayhuaca, en Lambayeque, producen con éxito más de 500 kilos mensuales de hongos comestibles procesados, que sirven para abastecer la

demanda de exclusivos restaurantes de Lima. Asimismo, la producción de ambas comunidades se destina a la alimentación de sus pobladores y a atender la demanda de los visitantes a las zonas de producción. En el caso de la Granja Porcón, el proyecto involucra a unas 250 familias (1,200 personas), que producen al año dos toneladas de hongos comestibles procesados. El kilo de hongo procesado cuesta 50 soles. Mientras que en la localidad de San Isidro Labrador de Marayhuaca participan 91 familias campesinas (550 personas), que tienen capacidad para producir dos toneladas de hongos procesados mensuales. Sin embargo, actualmente producen 500 kilos al mes, debido a falta de implementación de un invernadero para el pre secado para los hongos. Este proyecto es desarrollado con el apoyo de AGRORURAL. En Marayhuaca el producto se vende en el mercado a 35 soles el kilo. Ambas comunidades procesan los hongos que crecen en abundancia en los bosques de pinos, que existen alrededor de las zonas donde habitan, para luego ser envasados y comercializados. La población ha desarrollado capacidades productivas, comerciales y empresariales para el manejo sostenible de hongos comestibles de alto valor nutricional y comercial. Así, ambas comunidades han encontrado una manera viable para salir adelante y mejorar sus condiciones de vida”, sostuvo Marita Guzmán, gerente de la Fundación Romero. Actualmente la demanda de este alimento va en aumento. En Lima, es comercializado por la prestigiosa distribuidora Casa Banhero (Miraflores) y ya puede ser degustado en algunos restaurantes de la capital. Existen diversas formas de preparación de platillos a base de hongos, como anticuchos de hongos, cebiche de hongos, pollo relleno con hongos y queso al gratén, tallarín saltado con hongos, entre otros. Estas comunidades son el centro de atracción de otras comunidades del Perú, cuyos dirigentes llegan a dichas localidades para conocer el proyecto y poderlos replicar en sus lugares de origen.”

El Comercio, el 10 de Diciembre del 2010 (9), hacen una publicación sobre las diferentes formas de comercializar el hongo comestible:

“Hace quince años, unos pequeños brotes de pinos radiata se presentaron como la solución a la pobreza de Marayhuaca, una localidad enclavada en la sierra de Lambayeque, a más de 3 mil metros sobre el nivel del mar. Los pinos fueron plantados como parte de un proyecto de reforestación en extensos terrenos de la comunidad, los que eran aprovechados para el cultivo de menestras y otros productos de autoconsumo. En esas tierras ahora florece un frondoso bosque de 900 hectáreas, con unos 900 mil pinos de más de 50 metros de alto. En la base de cada uno de ellos crece un hongo comestible que sirve de materia prima para la elaboración de exquisitos panetones, que fueron lanzados ayer al mercado para competir con las mejores marcas comerciales. Los protagonistas de esta iniciativa son unas 120 familias de Marayhuaca, comunidad ubicada en el distrito de Incahuasi, quienes con el apoyo de especialistas no solo exportan hongos deshidratados sino que han decidido transformar los hongos en harina. Esta novedosa harina es utilizada como un ingrediente de lujo para el nuevo panetón”.

En anexos se puede apreciar la presentación comercial del panetón en base a harina del hongo (véase en anexos la figura N°4.2, en la página: 110)

En el diario La Primera el 3 de Abril del 2012 (15) publica sobre la extensión de la comercialización de los hongos comestibles en el Perú, difunde la noticia sobre el fomento del cultivo de hongos en Cajamarca:

“Sierra Exportadora en el marco del recientemente creado Programa de Hongos Comestibles para la Sierra Peruana, ha logrado concretar en zona sur de la Región Cajamarca, el primer acuerdo tripartito para implementar la instalación de un “Proyecto Piloto de Hongos Comestibles” en el Distrito de Cachachi, provincia de Cajabamba. Participarán en el proyecto la Municipalidad Provincial de Cajabamba, con el firme apoyo del alcalde, Wilson Pesantes Alayo, la Asociación de Productores de Condebamba, presidida por Marcial Quiroz Azañero y Sierra Exportadora, a través de su Centro de Promoción Económica (CPE) de Cajamarca, a cargo del ingeniero

Edgar Cabrera.Sierra Exportadora elaborará el perfil de pre inversión del proyecto con el cual se pedirá al Ministerio de Agricultura que lo declare viable a fin de comenzar su ejecución. La Municipalidad de Cajabamba financiará los gastos de la operación y mantenimiento del proyecto y la Asociación de Productores de Condebamba cederá un terreno de media hectárea donde se instalará el cultivo, así como aportará la mano de obra no calificada necesaria.El proyecto piloto de cultivo del hongo comestible tiene como objetivo validar el aprovechamiento de un nuevo producto alimenticio y de gran demanda en el mercado, para beneficiar inicialmente a aproximadamente 30 familias del centro poblado Tabacal del distrito de Cachachi, una zona de agricultura de subsistencia ubicada en la parte alta de la margen izquierda del gran Valle de Cajabamba.”

El Comercio el 28 de Agosto del 2012 (8) nuevamente hace difusión sobre los panetones del hongo comestible, pero en ésta ocasión hacen referencia sobre su participación en la feria gastronómica mistura que se realiza una vez al año en el Perú pero con ascendencia a nivel internacional:

“Un panetón elaborado con harina de hongos comestibles y frutilla deaguaymanto será exhibido por la comunidad campesina de Marayhuaca, del distrito de Incahuasi, en Lambayeque, en la feria gastronómica Mistura.Bernardino Lalopú Silva, director del Centro de Innovación y Desarrollo Rural de la Universidad de Lambayeque, adelantó que serán 2.000 los panetones de este tipo que serán comercializados por los campesinos.El panetón, que será comercializado en el stand 114 del Gran Mercado de Mistura, tiene un sabor muy agradable gracias al sabor que le da el aguaymanto deshidratado”, precisó a la Agencia Andina.Destacó, además, que ofrecerán harina, galletas y hongo deshidratado. “Es la tercera edición de Mistura en la que participarán las comunidades rurales de Incahuasi con el financiamiento de la Universidad de Lambayeque, recordó.”

El resultado de la venta de los panetones en mistura fue todo un éxito, agotándose rápidamente y con comentarios alentadoras de parte de los visitantes a ésta gran feria gastronómica.

4.3.- Cultivo de Hongos Comestibles:

SIERRA GALVAN, Sigfrido (29), de la Facultad de Ciencias de la UNAM hace un estudio sobre la historia, desarrollo actual y perspectivas en México y el mundo, de los hongos comestibles y su cultivo; del cual rescatamos lo siguiente:

“Se tienen registros de que se cultivó por primera vez un hongo macroscópico comestible (*Auricularia auricula-judae*) en China cerca del año 600 de nuestra era. En Europa se sabe que el champiñón (*Agaricus campestris*) se cultivó inicialmente en Francia hacia el año 1650. Muchas son las teorías dadas sobre el lugar de inicio del cultivo comercial de los hongos, pero la más generalizada es la que tiene como origen las cercanías de París, Francia. Se menciona que en la Francia del Rey Luis XIV, el jardinero de la corte, Olivier de Serres, aunado a los conocimientos del científico botánico Tournefort permitieron se realizara lo que puede considerarse como el primer cultivo moderno. Se señala que posterior a esto y durante muchos años los agricultores fueron recogiendo este tipo de hongo (champiñón), que luego vendían en los mercados mayoristas y por iniciativa de algunos de ellos, por el año de 1852 surgió la idea de recoger trozos de "blanco de hongo" (el micelio del champiñón), y sembrarlos en los hoyos donde posteriormente depositaban semilla de melón para su germinación; El resultado fue bueno, los hongos se desarrollaron acompañados del crecimiento del melón que con sus grandes hojas lo protegían del sol y las lluvias. En 1987 Steineck menciona que fue a finales del siglo XVIII cuando se comprobó que el cultivo realizado en galerías subterráneas, bodegas y minas proporcionaban resultados excepcionales. Los resultados de las investigaciones de Constantin y Matruchot en 1894, permitieron obtener la calidad óptima que daría a la fungicultura el carácter de industria agraria (Fernández, 2009).

En el intento de repetir la experiencia francesa, en situaciones ambientales muy distintas, el jardinero del Zar de Rusia llamado Oldaker, ideó un sistema de cultivo especial en invernaderos a finales del siglo XIX. Posteriormente emigra a Inglaterra en donde inicia en este país la fungicultura. Este sistema es el mismo que fue adoptado por los emigrantes Ingleses a Estados Unidos, donde fue perfeccionado a altos niveles mediante el llamado "Sistema Americano". En Alemania comenzó a practicarse con gran intensidad a finales del siglo XIX también, siendo en Renania, donde se encuentra el 50 % de las instalaciones alemanas dedicadas al cultivo del champiñón. Constantin y Matruchot mantuvieron en secreto su método haciendo de esto un monopolio por parte del Instituto Pasteur de Francia, hasta que en 1902, Ferguson, un estadounidense, publicó la descripción de las condiciones controladas para la germinación de las esporas del champiñón y el mantenimiento del micelio. Esto significó el fin del monopolio del mercado de cepas. Para 1903, Louis F. Lambert, inmigrante belga (o Francés), crea un laboratorio de cultivos puros en St. Paul, Minnesota. Hasta entonces los productores Estadounidenses importaban la composta inoculada desde Inglaterra. En 1907, la Lambert's American Spawn Company puso a la venta 7 diferentes cepas de *Agaricusbisporus* para venta a los productores Estadounidenses. En 1932, James W. Sinden, entonces director del programa de investigación en hongos de la Pennsylvania State University patenta la producción de "inoculo en grano". El sudeste de Pensilvania fue (y aún es) el mayor centro de producción de hongos de los Estados Unidos. En 1924, el Departamento de Agricultura de Pensilvania informó que el 85% de los hongos de ese país se cultivaban en Pensilvania. En 1930, la Oficina de Censos de los Estados Unidos reveló que había 516 cultivadores en aquel país y que 350 estaban ubicados en el Condado de Chester, Pensilvania (Mushroom Council, 2000-2006).

El American Mushroom Institute (AMI) fue creado por los cultivadores del Condado de Chester, Pensilvania. Desafortunadamente, la primera asamblea para el desarrollo del AMI fue celebrada el 4 de diciembre de 1941, sólo tres días antes de que los japoneses atacaran Pearl Harbor. Con los Estados Unidos involucrados en la Segunda

Guerra Mundial, esta nueva organización de los cultivadores de hongos fue dejada en espera. El 14 de enero de 1955, el AMI fue legalmente registrado como una organización sin fines de lucro.

Su propósito era promover el consumo de todos los hongos cultivados por medio de la investigación, la publicidad, la comercialización, la educación a los consumidores y las relaciones con el gobierno, así como por medio de ayudar a la industria a desarrollar mejores métodos de cultivo y de manejo. En 1985, la NationalMushroomGrowers' Association fue creada en Illinois para promover la venta de hongos frescos a nivel nacional. Ellos desarrollaron un programa de promoción en periódicos y revistas. A pesar de su pequeño presupuesto, el programa fue muy exitoso al recibir cobertura de revistas nacionales para mujeres y periódicos. Hacia 1990, la Ley sobre promoción, investigación e información al consumidor de hongos fue aprobada por el Congreso para reforzar la posición de la industria del hongo en el mercado, mantener y expandir los mercados existentes y los usos de los hongos, y para desarrollar nuevos mercados y usos de los hongos. En 1993, el Mushroom Council fue creado para llevar a cabo la administración de esta ley. El Mushroom Council comenzó con un pequeño presupuesto y mucha inspiración acerca de la promoción de los hongos. Comenzaron realizando investigaciones para definir en detalle usuario de hongos que se convertiría en la base de todos sus esfuerzos de comunicación. Una vez que el campo de trabajo fue establecido, un exitoso programa de promociones comenzó a tomar forma.

En 1996, el Mushroom Council estuvo presente en más de diez revistas nacionales para mujeres, incluso FamilyCircle, Women's Day y GoodHousekeeping. En la actualidad, el Mushroom Council juega un rol muy importante en la promoción nacional de hongos frescos mediante las relaciones públicas con los consumidores, las comunicaciones de los servicios de comida y las comunicaciones con los vendedores al por menor. Gracias al Mushroom Council, los hongos tienen su propio mes para ser honrados y comidos. Septiembre es el Mes Nacional del Hongo en los Estados Unidos. En la actualidad, los hongos se producen comercialmente en casi

todos los estados de aquel país. Sin embargo, Pensilvania aún tiene el 61% de la producción total de los EE.UU, que en 2006/07 alcanzó los 827 millones de libras (Mushroom Council, 2000-2006).

Para los años 70's el "inoculo en grano" o "semilla" desplaza por completo al estiércol inoculado de la mayoría de los países productores de hongos. Actualmente la fungicultura se practica en más de setenta países y junto al clásico cultivo del champiñón, se han multiplicado las investigaciones para poder producir en los países Orientales otras especies de hongos gastronómicos muy apreciados (Fernández, 2009)."

4.3.1.- Cultivo de Hongos Comestibles en el Perú

VASQUEZ VALENCIA, N. B. en el 2010 (38), en su trabajo monográfico para optar el título de Ingeniero Agrónomo, realiza el proceso del cultivo de champiñones y concluye:

- 1) Es muy importante la selección de los insumos así como la fórmula del sustrato a utilizar ya que de ello dependen nuestros rendimientos y nuestros costos de producción.
- 2) El cuidado y monitoreo de la fase I y II son el punto crítico de nuestro proceso de producción. Un error a éste nivel nos llevará a no recuperar nuestra producción, así el resto de procesos se haga bien.
- 3) Una buena semilla nos da como resultado un buen desarrollo del micelio en el compost y éste crecimiento será más rápido cuanto más inóculo se tenga.
- 4) El tipo de cobertura y el grado de humedad que mantengamos en la misma nos permitirá tener una buena forma de pines y por ende una buena producción.
- 5) La cosecha y la selección no da mayor ventaja competitiva con respecto a otras empresas en el mercado, lo cual nos permite posicionarnos en la preferencia del consumidor.

Además es interesante señalar las recomendaciones según su experiencia:

- 1) Se deben hacer pruebas con insumos que no tengan alto costo, debido a que los actuales insumos que se usan en el Perú para producir champiñones aumentan constantemente de precio porque están siendo utilizados como alimento para la ganadería.
- 2) La pasteurización en masa resulta ser mucho más eficiente que aquellas que se realiza en la misma sala de producción. Eficiencia que se alcanza por aprovechar el calor generado por el compost. Recomiendo el uso de un sistema de pasteurización en masa.
- 3) Además de la cantidad de inóculo también hay que tener en cuenta una buena mezcla, lo cual contribuirá con un rápido desarrollo del micelio en el compost. Es recomendable disponer de maquinaria para la siembra con dosificadores de semilla para una buena mezcla.
- 4) Se debe atender la demanda creciente del champiñón en provincias, ya sea incrementando las producciones y envío, o instalando nuevas plantas productoras en las zonas de mayor demanda para evitar el costo del transporte.

Medina Ciudad, R. en el 2003 (19), en su tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo evalúa el comportamiento del hongo del sol *Agaricusblazei*Murril; para lo cual utilizó la semilla de *Agaricusblazei* obtenida originalmente por CINCEYT en Brasil y cultivada en un área de 90 m² adecuando un ambiente que fue una granja de porcinos en tumbes y, llegando a las siguientes conclusiones:

- 1) La temperatura y la humedad relativa promedio de tumbes, de 28,5 °C y 76% respectivamente, permitieron fácilmente adecuar éstos factores a los requerimientos de *Agaricusblazei* para su desarrollo.
- 2) La producción alcanzada fue de 6 105 gramos de peso seco obtenida en función a una tonelada de compost, permitiendo obtener un ingreso neto de 703,88 nuevos soles.

Pavlich Herrera, Magdalena y otros en el 2001(21) hacen una descripción sobre el procedimiento del cultivo artesanal y convencional de algunas cepas nativas del Perú:

“Se describen los procedimientos para el cultivo artesanal y convencional de cepas nativas de, *AuriculariafuscosuccineaPleorotusostreatus*, colectadas en Maranura, Cusco y de *Pleorotusostreatoroseus* de Chanchamayo, Junín. En un periodo de 6 años hemos realizado repetidos cultivos de las cepas aisladas, conservadas en nuestra micoteca UPCH desde la colecta del hongo, aislamiento del micelio, propagación, inoculación, producción y consumo a pequeña escala. Así como su difusión en cursos de capacitación en los departamentos de Piura, Trujillo, Tacna, Huánuco, Ayacucho, Lima. El objetivo primordial fue el dar a conocer una novedosa alternativa alimenticia así como una forma de incrementar la economía familiar en el ámbito local, regional, sobre todo a pobladores de zonas donde crecen éstos hongos espontáneamente, y los consumen esporádicamente en determinada época; con el cultivo habría la disponibilidad de abastecimiento de todo el año, para consumo o venta.”

Así mismo, Magdalena Pavlich Herrera; en la parte introductoria del citado trabajo anteriormente hace referencia de los residuos agroindustriales que se emplean para el cultivo de las setas comestibles y una breve historia sobre la industria champiñonera en el Perú:

“Hemos incursionado durante varios años, en el cultivo de cepas nativas de hongos comestibles, con el convencimiento que es el momento propicio para introducir, propagar, producir, nuevas alternativas alimentarias de hongos que pueden cultivarse en residuos lignocelulósicos; que son descartados de la agroindustria, como paja de cereales, bagazo de caña, coronta de maíz, pulpa de café, entre otros, a la vez que con el aprovechamiento de estos residuos se evita la contaminación ambiental y por otro lado si consideramos que el cultivo comercial de especies rentables se ha ido incrementando en el país, y en el mundo como ocurre con el champiñón

Agaricusbisporus, el “Shiitake” Lentinulaedodes, comprobándose sus cualidades nutricionales y la calidad de sus aminoácidos esenciales, así como que refuerzan el sistema inmunitario y ayudan a reducir el colesterol (Susuki; et al; 1976).

En el Perú comenzó la industria champiñonera hace más de 30 años con la fábrica Compas, a cargo del ingeniero Sears, quien se separó y dio inicio a su propia producción en la Encantada (Villa); Don Hongo, Paccu, Champipac y Setas Solís que produce a pequeña escala con cepa importada de Pleorotusostreatus, y aún no es el momento de considerarnos micófilos ni de tener una vasta cultura micológica. Los hongos se expenden frescos en los supermercados de Lima, los hongos enlatados vienen importados de Corea y China, y tienen un precio razonable. La información sobre cultivo de hongos comestibles es restringida en nuestro país. Nuestra intención es enseñar a distinguir los hongos comestibles de los venenosos (éstos últimos escasos en el Perú).”

Talledo Rodríguez, Gaby en el 2000 (33), hace una descripción del procesamiento del cultivo de Champiñones:

“Es impresionante comprobar que existen mayor número de champiñonera produciendo “hongos comestibles” y que además el consumo de los mismos ha aumentado considerablemente. Las personas argumentan que la consumen porque poseen vitaminas, proteínas y además propiedades medicinales.

El Cultivo del champiñón tiene 4 etapas definidas:

- Producción de semilla
- Fermentación del compost y pasteurización del mismo.
- Inoculación e incubación del hongo
- Fructificación y cosecha.

1. Producción de semilla: La producción de semilla se realiza con mucho cuidado y asepsia. Debemos preparar anticipadamente el medio de cultivo que

vamos utilizar ya sea Papa Dextrosa Agar, agar soya, agar maltosado, entre otros. El cual será vertido en Erlenmeyer que serán tapados con algodón para luego ser esterilizados. El medio debe ser vertido caliente en placas de Petri (máximo 1 cm) y le dejamos que solidifique unos minutos para luego colocar una porción del hongo sobre la superficie del agar. El micelio tardará aproximadamente 15 días en invadir todo el agar. Paso seguido, se coloca una porción del hongo de las placas en granos de cereales estériles. Su crecimiento tardará también, aproximadamente, 15 días. El lugar donde se coloque las placas y granos inoculados debe estar entre 23-25°C. Cuando finaliza su desarrollo se guarda en refrigeración a 2°C.

2. Fermentación del compost y pasteurización del mismo: La fermentación del compost puede durar de 18 a 21 días. Consiste en mezclar 65-75% de paja de trigo, arroz, bagacillo de caña, etc. Con 25-35% de estiércol de caballo al que se agrega 3-4% de sulfato de amonio, 3-4% de superfosfato y 6-8% de cal. Se le adiciona agua tratando de que no sobrepase el 70% con respecto a 30% de materia seca. Toda la mezcla se amontona tratando de que no sobrepase el 1.80 m. La temperatura debemos virarla cada tres días y añadirle agua para mantener el 70 % inicial. El compost estará listo cuando su temperatura interior se encuentra a temperatura ambiente y haya cesado el olor a amoniacado. Paso seguido lo vertimos en cajas de madera de 1 m de ancho y un 1 m de largo o 0.90 por 0.60m., otra opción puede ser cajas de 0.50m por 0.50 m y un alto de 0.20. El compost dentro de la caja debe tener una altura máxima de 15cm. A continuación procedemos a pasteurizarlo por 4 días a 60°C, dos horas diarias con vapor de agua.
3. Inoculación e incubación del Hongo: Después de la pasteurización dejamos enfriar el compost por unas horas, para proceder a inocular la semilla previamente invadida sobre granos de cereales estériles. El desarrollo del micelio del hongo tardará en el compost. Cuando éste finalice debemos añadir

1.5 a 3.0 cm de tierra de cobertura estéril (pasteurizada a 60°C por 6 horas). Esta tierra puede ser arena de río o musgo.

4. Fructificación y Cosecha: Tras la aparición de los primeros ejemplares, pasará poco tiempo para que aparezcan masivamente, momento propicio para decidir el momento de la cosecha, cuando la mayor parte de los champiñones han extendido su sombrero un 70 %. La cosecha se puede realizar en forma manual aplicando al pie un giro de 180° en sentido horario. Paso seguido cortamos la parte del pie que posee restos de compost adherido.”

Talledo Rodríguez, Gaby en 1997 (34), también realizó un análisis sobre las setas en el Perú como una alternativa económicamente rentable utilizando residuos agroindustriales:

“La industria maderera, la agricultura y la agroindustria, arrojan anualmente grandes cantidades de productos de desecho, tales como aserrín, rastrojo de maíz, cebada, frijol, café, broza de espárragos, bagacillo de caña entre otros. **Los cuales en su mayoría son utilizados en forma ineficiente o desechados por desconocimiento de otros usos**, por parte de las personas dedicadas a estas actividades. Estos subproductos, son muy utilizados en el cultivo de diversas **setas de alto valor económico**. En el Perú el cultivo de hongos comestibles sería una forma rentable de utilizar dichos subproductos, ya que ésta actividad se viene difundiendo cada vez más a nivel mundial, generando empleo y a la vez utilidades económicas. Las especies que crecen bien y desarrollan en restos celulósicos y lignícolas son: el *Lentinula edodes* (Shiitake o Tonku), *Pleurotus ostreatus* (champiñón ostra), *Pleurotus eryngii* (seta del cardo), y el más conocido y difundido, el *Agaricus bisporus* o champiñón, cultivo que se ha extendido en Europa, Asia y América y cuya demanda ha aumentado en los países Occidentales, como Brasil, Chile, Estados Unidos, Canadá y Perú. Su creciente demanda se debe a que, además de poseer un sabor y olor agradable, es una fuente rica en proteínas, vitaminas B1, B2, B6, B12, C, Riboflavina, niacina, y minerales. Además, poseen propiedades medicinales, ya que contienen sustancias que detienen

la evolución del cáncer; propiedades antitumorales, antivirales y que disminuyen los niveles de colesterol y glucosa en la sangre. Entre los minerales que presentan encontramos: K, P, Mn, Cl, Si, S, Zn y Al y contienen alto contenido de fibra. Las calorías que proporcionan son bajas; es por este motivo que es considerado como un alimento dietético, de bajo valor energético, cuyo valor oscila entre 6,4 y 26,6 cal/100gr.”

Ríos Ruiz, Rolando A. y Ruiz Rengifo, Ladislao en 1 993 (27); en su trabajo de investigación realizaron el aislamiento y cultivo de una seta de la selva de Tingo María, evaluando algunas variables que influyen sobre el crecimiento durante su cultivo:

“Los hongos comestibles constituyen un gran potencial alimenticio para las regiones de la Amazonía donde abundan en forma natural. Con la finalidad de estudiar la metodología más adecuada del desarrollo de la seta comestible *Pleurotus* afin *ostreatus* se realizó un estudio en la región de Tingo María. Inicialmente se estudió el aislamiento y cultivo del hongo a partir de tejidos y basidiosporas y su identificación; luego se evaluó los efectos de medios de cultivos, los de luz y los de temperatura en el desarrollo micelial y de basidiocarpos. Los resultados demostraron que el mayor promedio de desarrollo micelial se consiguió a partir de aislamiento y cultivo de tejidos del hongo previa desinfección. Por sus características externas e internas o microscópicas se identificó al hongo como *Pleurotus* afin *ostreatus*. Mejor desarrollo micelial, mayor formación de basidiocarpos se tuvo mediante el medio de cultivo de trigo autoclavado. Para efectos de condiciones de luz, mayor desarrollo micelial se consiguió usando el medio de cultivo de trigo autoclavado sometido a oscuridad, mientras que para el desarrollo de basidiocarpos resultaron mejor los tratamientos sometidos a luz. Ambos procesos con un rango de temperatura entre 25° a 29° C.”

4.3.2.- Importancia comercial del cultivo de champiñones en el Perú:

Talledo Rodríguez, Gaby en el 2003 (35) hace un interesante análisis sobre la situación comercial de los champiñones en el Perú, fomentando al cultivo del mismo y señalando el crecimiento de la demanda de éste producto alimenticio en nuestro medio:

“En anteriores artículos hemos hablado de la evidencia de que los hongos en el Perú, se consumen desde la época de la cultura Moche (representaciones iconográficas). En esos tiempos se les denominaba Callampa o Paco y se les utilizaba en épocas de escasez. Actualmente son consumidas en diversas provincias como: Cusco, Puno, Huánuco, Arequipa, Trujillo, Piura, Huaraz, Lambayeque, Cajamarca, entre otros, pudiendo ser estos, hongos nativos o cultivados en forma industrial. Existe una tendencia creciente a utilizar los hongos como un ingrediente culinario, dada su versatilidad en la cocina, ya que se pueden preparar en salsas, a la parrilla, en sopas, como guarnición, saltados, en ensaladas, en cebiches, entre otros. Por otra parte, el bajo contenido de grasas y calorías de los hongos, permite sacar ventaja a la tendencia a preferir productos light. Para el cultivo de hongos comestibles se puede utilizar, desde tecnologías artesanales, hasta tecnologías con altos grados de industrialización; sin que ello implique diferencias en la calidad de la producción; y en algunos casos tampoco en el rendimiento. Se puede determinar el grado de industrialización con el que se va a contar, en cada etapa del proceso productivo, es decir, existe la posibilidad de adaptar la tecnología de acuerdo a los recursos con los que contamos, los costos y necesidades del proceso operativo. Los puntos críticos del proceso productivo son: la preparación de la semilla, la fermentación del compost, la pasteurización y la producción. Asimismo, se debe poner especial cuidado en el control de la temperatura, la iluminación, la humedad relativa y la ventilación. La implementación de un proyecto relacionado al cultivo de champiñón debe ser una alternativa para satisfacer las necesidades alimenticias a nivel local, crear fuentes de trabajo, ingresos, e incentivando actividades conexas como: transporte, industria de empaques, proveedores de semillas y equipo etc. Las empresas nuevas que deseen

incursionar en esta actividad deben destacar su alto valor nutritivo y propiedades medicinales, bajo contenido de material graso y diversidad de usos. Aprovechando de esta manera una oportunidad de negocio, ya que existe un déficit en la oferta nacional de hongos comestibles, por lo que se hace necesaria la importación de los mismos. Existe una demanda insatisfecha de hongos comestibles, un potencial de crecimiento del mercado y la oportunidad de que entre un nuevo competidor que desarrolle procesos productivos eficientes, que ofrezcan productos a precios competitivos. El segmento del mercado al cual se dirija debe estar compuesto por hoteles de cuatro y cinco estrellas; restaurantes internacionales de cuatro a cinco tenedores, restaurantes vegetarianos (en muchos casos pueden sustituir a la carne), bufetes de prestigio, empresas distribuidoras de alimentos preparados para aerolíneas, pizzerías, empresas de fastfood, supermercados y minimarkets. Cabe señalar que los supermercados tienen un alto poder de rotación, pues su costo de cambiar marcas es relativamente bajo y la cantidad del producto que compran al mes, es significativo. También se deben tener como clientes potenciales a empresas que utilicen las setas como insumo para fabricar: encurtidos, polvo de hongos, cremas y sopas. Las variedades que más demandan los restaurantes, hoteles, empresas distribuidoras de alimentos preparados para aerolíneas y bufets, son el champiñón de París, el portobello y el Shiitake seco. Se destaca que en los restaurantes orientales, existe una mayor demanda de esta última variedad con respecto a los otros. En los supermercados y minimarkets se demandan generalmente el champiñón de París, el portobello y las setas. No se realizan importaciones de hongos frescos. En nuestro país, se observa un mayor consumo de hongos por parte de personas que pertenecen a niveles socioeconómicos altos (A y B) por dos razones fundamentales: su nivel de ingreso les posibilita acceder al consumo de comida gourmet y su ascendencia extranjera, en algunos casos, determina su costumbre a consumir hongos en diversas comidas. En los países en los que se ha desarrollado más esta industria, se ha contado con el apoyo del gobierno en cuanto a abastecimiento de semillas, apoyo técnico y financiero; esto ha sido un factor clave para promover las exportaciones y auge de estos productos.”

4.4.- Fermentación líquida de Macromicetes:

La fermentación líquida es un método biotecnológico que permite obtener no sólo biomasa sino también metabolitos con acción farmacológica y, considerando que en la diversidad de macromicetes comestibles existen especies con bondades farmacológicas es que, éste método es una alternativa para la obtención de los principios activos con propiedades curativas para ciertas dolencias humanas.

Suarez Arango, Carolina y Jeannette Nieto, Ivonne en el 2011 (30), realizaron una revisión sobre los cultivos biotecnológicos de macrohongos comestibles, como una alternativa en la obtención de nutraceuticos:

“Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles del año y aparecen descritos como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Se han descrito muchísimas propiedades nutraceuticos de los macromicetos, como sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolemicas, antivirales, antibacterianas, o inmunomoduladoras, entre otras. Dado que la producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos en algunos casos son muy dispendiosas, la biotecnología es fundamental para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de estos metabolitos. Es el desarrollo de esta tecnología y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, lo que ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con significativa reducción de tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de compuestos con potencial como medicamentos, nutraceuticos y cuasi farmacéuticos tanto del medio agotado como del micelio. El objetivo de esta revisión es el de ofrecer una visión general de la utilización de la fermentación en estado líquido como herramienta tecnológica para la obtención de hongos comestibles, su estudio y el de sus bioactivos, mediante la descripción de las diferentes condiciones de cultivo que en los últimos años se han empleado, así como los resultados obtenidos. Se discutirá lo correspondiente a los géneros *Agaricus*, *Flammulina*,

Grifola, Pleorotus y Lentinula, con énfasis en este último, dado que el Shiitake ha sido considerado desde siempre como el hongo medicinal por excelencia.”

Un ejemplo comercial de la aplicación de ésta tecnología es el medicamento lovastatina, cuyo principio activo es de la familia de los policétidos, con propiedades de inhibir la síntesis del colesterol y que son extraídos de los macromicetos pertenecientes a los genero *Pleorotus* y *Agaricus*; éste fármaco es empleado para pacientes con hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, así como también para aquellos propensos a la arterioesclerosis.

Suarez Arango, Carolina en el 2012 (31), aplica la fermentación en estado líquido para el cultivo se *Lentinula edodes*:

“*Lentinula edodes*, hongo comestible conocido en el mundo como Shiitake, posee diferentes acciones biológicas; que lo convierten en el nutraceutico natural por excelencia. El objetivo de la presente investigación fue el de establecer la producción de biomasa fúngica y bioactivos (polisacáridos y triterpenoides) durante el cultivo sumergido del hongo, para posteriormente introducirlos en una gelatina de fruta y evaluar su comportamiento en la matriz a través del tiempo. Se obtuvo un rendimiento en biomasa fúngica cercano al 90%, mientras que la producción de polisacáridos bioactivos, los β -glucanos, tuvieron una alta producción por el micelio pero con baja excreción. En lo que respecta a los ácidos grasos se encontró una diferencia estructural entre los presentes en el micelio y los excretados al medio de cultivo. En cuanto a los compuestos triterpenoidales, éstos fueron identificados únicamente en el micelio, dentro de los cuales se encuentran tres posibles nuevos compuestos para el hongo. Con relación a la gelatina con fruta ésta presentó un importante contenido de los β -glucanos, lo que podría conllevar una reacción benéfica sobre el organismo que las consuma. La presencia de esos bioactivos, hace que algunas de las propiedades reológicas de la gelatina cambien significativamente, sin presentar influencia en la percepción por parte de los consumidores. Los

resultados dan pie para adelantar posteriores investigaciones que lleven a mejorar la productividad de biomasa y metabolitos, para incluirlos en otros tipos de alimentos que sean consumidos por una proporción mayor de la población.”

4.4.1.- Fermentación Líquida del Género *Agaricus*:

Suarez Arango, Carolina en el 2011 (30), sobre el cultivo de *Agaricus* por fermentación en estado líquido señala:

“La primera fermentación en estado líquido de éste género de macromicetos fue descrita por Humfeld en 1948 empleando *Agaricuscampestris*. A pesar de que la especie más conocida de este género es *Agaricusbisporus*, comúnmente llamado champiñón de Paris, siendo el macromiceto comestible más cultivado a nivel mundial mediante técnica tradicional en sustratos compostados que por lo general se componen de desechos agroindustriales, el empleo de la fermentación en estado sumergido se ha realizado en su mayoría para procesos de biorremediación, encontrándose un solo reporte del empleo de la fermentación para la bioproducción del micelio de ésta especie con el propósito de obtener un análogo de la carne. La especie *Agaricusblazei*, también llamada *Agaricusbrasiliensis* o seta del sol, es la especie más utilizada en fermentación en estado líquido para la producción de polisacáridos y otros compuestos con acciones biológicas conocidas y posible uso farmacológico. Es así como en 2008 se realizó la caracterización de exopolisacáridos producidos por la especie en fermentación sumergida, estudios que fueron complementados en 2009 con la determinación del efecto de los polisacáridos extracelulares en la hipolipidemia y la selección de un medio de cultivo de bajo costo, con alta producción de biomasa y polisacáridos intracelulares. En 2010 se utilizó *Agaricusbrasiliensis* para la producción de exopolisacáridos y el estudio de la influencia de los diferentes métodos de secado en la actividad antitumoral presentada por éstos metabolitos, cuya extracción también fue estandarizada en ese mismo año. Así mismo, se estudió el efecto de la aireación en la producción de ergosterol y

blazeispiro. *Agaricusnovoi* se utilizó para hacer un estudio comparativo entre basidiomicetos en lo relacionado con la producción de exopolisacáridos por fermentación en estado sumergido empleando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.”

4.5.- Macromicetes como Biorremediadores:

La biorremediación es una tecnología para limpiar los contaminantes de un ambiente utilizando un organismo vivo y, en éste contexto los macromicetos son una alternativa para lograr tal objetivo. Se han realizado investigaciones sobre la utilización de los hongos comestibles como biorremediadores, las cuales citaremos a continuación:

Ortiz Moreno, Martha en el 2010 (20) señala sobre la utilización de los macrohongos como biorremediadores:

“Los macromicetos también han sido utilizados como biorremediadores e indicadores de bioacumulación de sustancias tóxicas en los ecosistemas, ya que sus micelios captan iones y compuestos presentes en el sustrato de crecimiento para luego acumularlos en los tejidos del cuerpo fructífero, de esta manera la cosecha y el análisis químico de estos tejidos permite monitorear la residualidad de xenobióticos y sustancias radioactivas en la cadena trófica. Hasta el momento no se ha masificado el cultivo de macromicetos para retirar sustancias tóxicas del suelo debido a que tienen una baja tasa de fructificación y crecimiento (Barnett *et al.*, 1999; Borovièka *et al.*, 2006).”

Cintia Elizabeth Paisio y otros en el 2012 (5), reportaron sobre la utilización de hongos macroscópicos para la remediación de mercurio:

“... Otros autores estudiaron la remoción de 100 mg/L Hg(II) por células vivas y muertas de *Agaricusmacrosporus* a diferentes valores de pH, observando que en todos los casos los porcentajes de remoción utilizando células vivas fue mayor que usando células muertas. Estos autores atribuyen la máxima capacidad de adsorción a

las células vivas, al medio de cultivo ácido suplementado con K y P (Melgar et al., 2007). Ya previamente, otros autores habían establecido que la captación de metales pesados por hongos y levaduras, podría estar asociada con la captación y acumulación de fósforo (Kurnst y Roomans, 1985). De manera contraria, Bayramoğlu y Arica (2008) analizaron la remoción de 500 mg/L Hg (II) por células vivas e inactivadas del hongo *Lentinulaedodes*. Ellos observaron que las células inactivadas fueron capaces de adsorber mayor concentración de Hg (II) comparadas con las células vivas. La bioadsorción en células vivas podría ser atribuida a ciertos mecanismos externos de acomplejamiento de metales, llevados a cabo por proteínas como las metalotioneínas o fitoquelatinas o bien por el bombeo eficiente de metales por la célula viva.”

En el Perú también se han realizado investigaciones sobre la utilidad de los hongos comestible como organismos biorremediadores; tal es así que; Talledo Rodríguez, Gaby A. en el 2008 (32), evalúa la capacidad de bioacumulación de metales pesados (Pb, Cd, Cu, y Hg) en especies de hongos de *Agaricusbisporus* y *Agaricusbrunnencens*, durante su periodo vegetativo, llegando a las siguientes conclusiones:

1. La bioacumulación del cadmio por el portobello y el champiñón es muy similar, acumulando igual cantidad independiente de la concentración inicial y del tiempo de contacto con ésta.
2. Con respecto al plomo, en las dos especies se notó una mayor bioacumulación, conforme aumentaba la concentración del metal (1,5 y 10 ppm) y el tiempo.
3. Tanto el champiñón como el portobello pueden emplearse como buenos indicadores de contaminación por plomo.
4. El portobello muestra un aumento en su acumulación de cobre en la primera, tercera y quinta oleada a concentraciones de 1 y 5 ppm. A 10 ppm se aprecia un tope en su acumulación independiente del tiempo de exposición. El champiñón aumenta su acumulación en las tres oleadas solo a 10 ppm, a 1

ppm muestra un decrecimiento en su acumulación y a 5 ppm una combinación de las dos anteriores.

5. Sobre el mercurio se puede concluir que tiene mayor poder de acumulación en la primera oleada, decreciendo en promedio conforme pasa el tiempo, tanto para el portobello como para el champiñón.
6. El comportamiento del hongo, versus el de otros vegetales es el de asimilar los metales pesados en un tiempo menor, por lo que se puede verificar los niveles de contaminación en un tiempo menor.
7. El consumo de excesivo de hongos, ante todos los silvestres, puede ser perjudicial si han desarrollado en zonas contaminadas con metales pesados o en donde se desarrollen actividades: mineras, siderurgias, industriales con alto grado de contaminación, entre otras.

4.6.- Estudios sobre el Agaricuscampestris:

4.6.1.-Características fenotípicas del Agaricuscampestris:

El macromiceto Agaricuscampestris ha sido reportado por varios autores como un hongo comestible que se desarrolla en el césped, tal vez por ello muchos lo conocen como el hongo de las praderas; en el Perú, fue descrito por Pavlich Herrera, Magdalena en el 2001 (22), en su trabajo sobre los hongos comestibles del Perú de la siguiente manera:

“Agaricuscampestris L. ex Fr.

Nombre vulgar: Champiñón, paccu.

Pileo ancho, convexo, expandido, blanco homogéneo a blanco sucio, liso ligeramente escamoso o fibroso, de 4 a 11 cm de ancho, a veces al centro del pileo de color parduzco; lamelas libres, numerosas de color pálido cuando jóvenes a marrón carneo con la edad; estípites blancos lisos, cilíndricos de 3 a 6 cm de longitud y de 1-2cm de ancho, velo presente, delgado, blanco algodonoso, compacto en los especímenes

jóvenes, anillo membranoso, sencillo no es persistente; vello rasgado en los especímenes adultos sin volva; basioesporas elipsoidales de 4.5-6x7-9.5 um de paredes lisas parduscas, con una o dos gúttulas. De sabor y olor agradable. Esporada marrón.

Hábitat: sobre el césped abonado en pajonales del territorio andino.

Distribución: Lima (césped abonado de jardines), Pasco (LocRicram) y Junín (Loc. Huasahuasi).

Se come frito en mantequilla.”

En anexos se muestra una fotografía escaneada del *Agaricus campestris* recolectada de Huasahuasi (véase en anexos la figura N° 4.3 en la página: 110)

En la enciclopedia libre de WIKIPEDIA (10) también hacen una descripción del *Agaricus campestris*:

“*Agaricus campestris* (L.) Fr., es una especie de la familia de Agaricaceae; (ver foto en anexos)

Nombres populares:

- **Castellano:** champiñón de prado
- **Catalán:** Camperol
- **Vasco:** Barren-gorri
- **Gallego:** Fungo dos lameiros

Descripción:

- **Sombrero:** de 6 a 10 cm de diámetro. Hemisférico, convexo y luego aplanado. Cutícula sedosa, fibrilosa de color blanco, fácilmente separable.

- **Pie:** corto, grueso, cilíndrico algo engrosado en la base. Liso de color blanco, con anillo simple membranoso y blanco.
- **Himenóforo:** láminas libres, apretadas, de color rosa vivo, luego chocolate y al final negruzcas.
- **Velos:** con anillo
- **Carne:** firme, compacta, gruesa, blanca que se colorea débilmente al corte. De sabor dulce y olor agradable.
- **Esporada:** marrón oscuro
- **Hábitat y época de aparición:** de primavera a otoño en prados y pastizales.
- **Toxicidad:** levemente tóxica, causa irritación cutánea. Es comestible”

En anexos se puede apreciar una imagen del *Agaricuscampestris* según la descripción realizada (véase en anexos la figura N° 4.4 en la página: 111)

Ardón López, Carlos Esduardo en el 2007 (2), en la Universidad de San Carlos de Guatemala en su trabajo de investigación para sustentar su maestría realiza la siguiente descripción del *Agaricuscampestris*

“AgaricuscampestrisFr.

Descripción: Píleo de 10 a 90 mm de diámetro, convexo a plano convexo, margen ondulado a recto y borde entero a desgarrado al abrirse, superficie húmeda, color blanco, con escamas de color claro, cutícula desprendible. Contexto de 6 mm de grosor, blanco, esponjoso. Sabor y olor afrutado. Himenio con láminas subadheridas a libres, anchas, muy juntas, color rosáceo en jóvenes y café en adultos, borde entero. Lamélulas truncadas. Velo parcial de color blanco que cubre las láminas en estadios juveniles. Estípite de 20 a 50 mm de longitud, 20 mm de diámetro de ápice y 18 mm de diámetro en la base, cilíndrico, superficie fibrilosa, color blanco satinado. Contexto lleno, color blanco, consistencia esponjosa y suave. Anillo adherido, algodonoso en el exterior, fibriloso en el interior, color blanquecino. Hábito: Gregario.

Hábitat: Sobre grama, principalmente donde hay estiércol de ganado vacuno. Comentario: Utilizado en Tecpán Guatemala, Antigua, San Juan Ostuncalco, Palestina de los Altos, Quetzaltenango Todos Santos Cuchumatán, Cuilapa, Santa Rosa, Jalapa (Bran *et al.*, 2005).”

En anexos se puede apreciar una imagen del *Agaricuscampestris* según la descripción realizada por el autor mencionado anteriormente (véase en anexos la figura N° 4.5 en la página: 111).

4.6.2.- Aislamiento y Cultivo del *Agaricuscampestris*:

Sobre el aislamiento y cultivo del *Agaricuscampestris* no se ha encontrado referencias bibliográficas, sólo se le ha considerado como un hongo comestible que se desarrolla de forma natural en las praderas, en el césped de los jardines o en suelos abonados; por ello en el presente trabajo se realizará las experiencias de aislamiento y cultivo según las metodologías recomendadas para el *Agaricusbisporus* y/o el *Pleurotusostreatus* para lo cual se recomienda revisar a Francisco Fernández, Michael (13); Gaitán Hernández, Rigoberto y otros (14); Pavlich Herrera, Magdalena (21 y 22) y; Ríos Ruiz y Ruiz Rengifo (27).

4.7.- Identificación Molecular de Microorganismos:

En las tres últimas décadas las técnicas de identificación molecular de los microorganismos se ha desarrollado considerablemente y resultan relevantes en los estudios de detección, funcionalidad y determinación de las relaciones filogenéticas de los microorganismos; y así lo señala R. A. Atlas y R. Bartha, 2008 (28):

“Posiblemente los avances más importantes en la ecología microbiana en los últimos años procedan de la aplicación de técnicas moleculares para la detección de microorganismos en muestras ambientales. El desarrollo de dichas técnicas permite detectar poblaciones microbianas concretas y sus actividades sin necesidad de cultivar los microorganismos. Muchas de estas técnicas se basan en la amplificación de secuencias signaturas moleculares y su detección por técnicas de hibridación,

especialmente usando sondas de oligonucleótidos (Maniatis et al. 1982). Ahora las técnicas basadas en ácidos nucleicos constituyen el principal medio para detectar poblaciones microbianas concretas en el ambiente (Tiedje et al. 1995). Las relaciones filogenéticas de las bacterias, arqueos bacterias y microorganismos eucariotas también pueden estimarse mediante el uso de sondas génicas y de análisis molecular, lo cual permite tener una perspectiva del mundo microbiano natural (Pace 1996).

Recuperación de ácidos nucleicos. Para detectar genes específicos o RNA mensajero o ribosómico (mRNA o rRNA) para estudios ecológicos, es necesario recuperar ácidos nucleicos de las muestras ambientales. Esto normalmente implica purificaciones extensivas para eliminar las proteínas, los ácidos húmicos y otros compuestos que podrían interferir con el análisis de los ácidos nucleicos. Se ha desarrollado una serie de métodos específicos para el análisis de ácidos nucleicos para aplicaciones ambientales (Atlas 1993). Se han usado dos enfoques distintos para la recuperación del RNA y del DNA de las muestras: el aislamiento de las células microbianas seguido de lisis celular y purificación de ácidos nucleicos (extracción celular), y la lisis directa de células microbianas en la matriz ambiental seguida de la purificación de los ácidos nucleicos (extracción directa) (Steffan et al. 1988)...”

4.7.1.- Identificación Molecular de Hongos:

Las técnicas moleculares también son aplicables a los microorganismos eucariotas y, para el caso específico de los hongos ha permitido facilitar la laboriosa identificación morfológica y bioquímica; y así lo señala Haybrig Mercedes Perdomo Ziemis en el 2011 (23) y realiza una revisión sobre las técnicas moleculares aplicadas al estudio de los hongos en la parte introductoria de su tesis doctoral:

“**La biología molecular aplicada a la taxonomía y tipificado de los hongos Filamentosos:** La taxonomía e identificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la caracterización fenotípica de los mismos. La sistemática atribuía valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto

macroscópica como microscópica, es decir, presencia o ausencia de septos en las hifas, formación de esporas y mecanismos de liberación de las mismas, o aspectos de la biología y ecología de estos organismos, así como resultados obtenidos a través de pruebas bioquímicas o el estudio de su ultra estructura. Datos que, en conjunto, han permitido establecer las diferentes categorías taxonómicas hasta nivel de especie y, en algunos casos, hasta niveles inferiores (Webster y Weber, 2009). Actualmente, la aplicación de técnicas de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado muchos los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica (Guarro et al., 1999a)...

... Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack y Binnicker, 2009). Los métodos electroforéticos más frecuentemente utilizados para el estudio de los hongos son el “Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción” (RFLP), que permite en algunos casos diferenciar molecularmente cepas de una misma especie; el análisis de la “Amplificación al azar de Fragmentos Polimórficos de ADN” (RAPD), que se aplica, por ejemplo, para realizar estudios de población al permitir determinar la variabilidad intraespecífica entre cepas de una misma especie; el análisis del “Polimorfismo de los Fragmentos de Amplificación” (AFLP) que presenta similares usos a los descritos en el método anterior. No obstante, estos métodos suelen presentar inconvenientes tales como elevada laboriosidad, problemas de reproducibilidad entre laboratorios, difícil la automatización en los procedimientos, y en algunos casos, como en el RFLP, no tener una suficiente capacidad de discriminación a nivel interespecífico (Gil-Lamaignere et al., 2003; Webster y Weber,

2009). En relación a la secuenciación, cabe destacar que existe una amplia lista de genes utilizados para estudios de identificación y/o filogenia de los hongos, siendo los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ADNr) los más utilizados para dichos estudios, estos genes se encuentran distribuidos formando tandems (18S-5.8S-28S), separados por regiones no codificantes denominadas espaciador interno transcrito (ITS) y espaciador intergénico (IGS). Los ITS generalmente se corresponden con secuencias altamente conservadas entre las especies fúngicas filogenéticamente próximas, en tanto que los IGS presentan una variabilidad muy elevada, incluso a nivel intraespecífica. Otra característica que determina la amplia utilización de estos genes, es el hecho de encontrarse en un número elevado de copias (hasta 200 copias), facilitando su amplificación mediante la PCR (Butler y Metzberg, 1989). Para el diagnóstico micológico, las secuencias conservadas se utilizan generalmente para confirmar la existencia de una infección fúngica, en tanto que las variables se emplean en la identificación a nivel de especie del agente etiológico implicado (Guarro et al., 1999a; Wengenack y Binnicker, 2009). En algunos casos, estas regiones no proporcionan suficiente resolución para diferenciar especies filogenéticamente muy próximas, y es cuando se recurre al estudio de otros genes, principalmente estructurales que codifican para diferentes proteínas. Entre los genes más utilizados se pueden citar: la β -tubulina (TUB y BT2), la actina (ACT), la quitina sintasa (CHS), el factor de elongación (EF-1 α) o la calmodulina (CAL). Estos genes, o fragmentos de los mismos, se han utilizado para estudios filogenéticos de algunos hongos patógenos humanos, tales como especies pertenecientes a *Fusarium* (EF-1 α), *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. (BT2), *Scedosporium* (TUB y BT2) o *Sporothrix* Hektoen & C.F. Perkins (CHS, CAL) (Gilgado et al., 2005; Marimon et al., 2006; Damm et al., 2008; O'Donnell et al., 2009). Las secuencias de los genes obtenidas y su comparación con aquellas depositadas en bases de datos internacionales, como el GenBank, permite ubicar taxonómicamente y/o confirmar la identificación de especies fúngicas e incluso, aunque más raramente, tipificar las cepas de una especie. En relación a este último punto, aunque son muchos los

sistemas de tipificación disponibles (Gil-Lamaignere et al., 2003; Webster y Weber, 2009), el sistema de “Tipificación Mediante Secuenciación Multilocus” (MLST) es el más recomendable por presentar gransensibilidad y especificidad al trabajar con secuencias de ADN, lo cual disminuye o incluso elimina problemas de reproducibilidad entre laboratorios. Además, permite fácilmente publicar en internet los resultados obtenidos para hacerlos accesibles rápidamente al resto de la comunidad científica (Maiden, 2006).”

4.7.2.- Identificación molecular de *Agaricus*:

Capelari M., Rosa, LH. Y Lachance, M. en el 2006 (4) realizaron un trabajo sobre la afinidad de *Agaricusmartineziensis* en el cual utilizaron técnicas moleculares y siguieron la siguiente metodología:

“Se extrajo el ADN con el Mini Kit QIAamp (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Tejido tapa seca (50 mg) se homogeneizó en 360 l ATL tampón. Proteinasa K (40 l, proporcionado con el kit), 40 l de RNasa A (20mg ml⁻¹), y se añadieron 400 l de tampón AL, y el homogeneizado fue incubado a 56 ° C durante 30 min. Se añadió 440 l de etanol (95%) y la mezcla se centrifugó brevemente para sedimentar los sólidos. El sobrenadante se cargó en una columna Qiagen y se procesa como se recomienda por el fabricante. La subunidad ADN_r se amplificó mediante la adición de ADN purificado (1 l, A₂₆₀ = 2,5) a una reacción de 50 l de PCR. Los cebadores fueron NL1 y NL4, y las condiciones fueron las descritas por Kurtzman y Robnett (1998). La secuenciación se realizó con los mismos cebadores en un secuenciador ABI en el Instituto John P. Robarts Research, Londres, Ontario. La secuencia fue comparada con las disponibles en el GenBank. Secuencias similares fueron seleccionadas para la alineación y la construcción de un árbol filogenético por análisis neighbour-joining utilizando el programa DNAMAN (Vaudreuil, Quebec, Canadá).”

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales:

Agar Papa Dextrosa	Horno esterilizador
Agar Sabouraud Glucosado	Incubadora
Agua destilada	Lejía
Algodón	Matraz Erlenmeyer de 250 ml; 500 ml.
Asa de siembra	Mechero de Bunsen
Autoclave	Olla a presión
Baguetas de vidrio	Papel Kraft
Balanza de precisión	Pipetas de 5 ml. y 10 ml.
Bolsas de polipropileno	Placas de Petri
Carbonato de calcio	Probeta
Cereales: Cebada, trigo	Refrigeradora
Estuche de disección	Sulfato de calcio
Etanol	Superfosfato
Frascos de boca ancha	Termómetro
Gras residual de la poda de las áreas verdes	Tubos de ensayo de 15x150mm

5.2 Población

El Universo: Se realizó muestreos en forma aleatoria de las áreas verdes, específicamente del césped o suelos de cultivo de Lima y Callao, los hongos macroscópicos (setas) que desarrollan de forma natural con características fenotípicas propias del *Agaricuscampestris*.

El gras residual para la elaboración del sustrato y para el cultivo de las setas se obtuvo principalmente de las áreas verdes de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Callao, tomándose como muestra de las podas de gras realizadas por los trabajadores y dispuestas en un área de desmonte, en donde lo dejan secar y luego proceden a incinerarlo o a la espera del camión de la municipalidad para su recojo. Pero en situaciones de no encontrar éstos residuos en la Ciudad Universitaria también se utilizó los residuos de la poda del césped de las áreas verdes de la Av. Juan Pablo II a fueras de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Callao.

5.3 Técnicas e instrumentos de investigación.

Es un trabajo de investigación experimental, que se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Microbiología de la facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao y; en relación a la identificación molecular de la cepa de hongo aislado se llevó a cabo con el apoyo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (UNMSM). El compostaje se efectuó en el campus de la ciudad universitaria, promoviendo la fermentación en pilas en cilindros y/ costales.

5.4 Técnicas de análisis:

Los datos recopilados de los resultados de los experimentos basados en la observación de crecimiento de los micelios, obtención del blanco o semilla sobre los granos de cereales y fructificación de los mismos fueron fotografiados.

Los datos de la evaluación del proceso de compostaje fue la temperatura por día, los cuales se presentaran en cuadros y graficas estadísticas. Y en relación a la identificación molecular de la cepa del hongo aislado se presenta el informe brindado por el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (UNMSM).

5.5 Metodología

5.5.1 Muestreo de ejemplares de hongos macroscópicos

Se buscó ejemplares de hongos macroscópicos del césped de las áreas verdes de Lima y Callao con características fenotípicas de los *Agaricus campestris*.

Para el muestro del ejemplar se eligió al de mayor tamaño y de mejor vitalidad realizando el siguiente procedimiento:

1. Se le aplicó un giro para romper el estípote del hongo
2. Se envolvió con papel Kraft y se transportó al laboratorio para su aislamiento dentro de un frasco limpio de boca ancha en el más breve tiempo.

5.5.2 Obtención de Cultivo puro de la seta muestreada

Para obtener el cultivo puro o micelio de la seta muestreada se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao, considerando el procedimiento empleado por Magdalena Pavlich Herrera 2001 (21) y, las recomendaciones según el Manual Práctico de Cultivo de Setas: Aislamiento siembra y producción de Rigoberto Gaitán Hernández 2006(14). Además, teniendo en cuenta el resultado de aislamiento de una seta de la Selva de Tingo María por Ríos Ruiz, Rolando y Ruiz Rengifo, Ladislao, en 1993 (27), en el cual demostraron que; el mayor promedio de desarrollo micelial se consiguió a partir de aislamiento y cultivo del carpóforo del hongo previamente desinfectadaes que; para el presente trabajo de decidió realizar el

aislamiento a partir del carpóforo recolectado y descartar el aislamiento a partir de la esporada del hongo.

5.5.2.1 Preparación del medio del cultivo para el aislamiento de la seta:

Preparación del Agar Sabouraud Glucosado modificado:

En las primeras experiencias sobre las siembras de trozos del píleo sobre el Agar Sabouraud Glucosado o el Agar Papa Dextrosa no se obtuvo éxito en el aislamiento del micelio de la seta, llegando incluso a contaminarse con otros microorganismos; para mejorar el medio de cultivo se consideró las recomendaciones sobre los medios de cultivo del Manual Práctico del Cultivo de setas de Rigoberto Gaitán Hernández y otros 2006 (14); por ello considerando que las setas a aislar crecen de forma natural en el césped es que se preparó el Agar Sabouraud Glucosado modificado siguiendo el siguiente procedimiento:

- Hacer hervir ½ litro de agua más 50g de gras seco en una olla hasta conseguir 250 ml de agua. (Caldo extracto del gras residual).
- Pesar 32.25g de Agar Sabouraud Glucosado
- Medir 250ml del caldo con la ayuda de un colador en un vaso de precipitado.
- Luego en un matraz de 500ml agregar el Agar Sabouraud Glucosado más el caldo ya colado y completar con agua destilada, hasta alcanzar los 500ml de solución.
- Cubrir la boca del matraz con papel metálico y llevarlo a la autoclave para su esterilización a 121 ° C, 15 lb de presión por 15 minutos.
- Después de esterilizarlo en el autoclave, agregarle a la solución un antibiótico (tetraciclina 0.4gr/l) para asegurar que solo crezca el hongo.

5.5.2.2 Desinfección de la muestra

- Realizar la desinfección de la mesa de trabajo con etanol y con la ayuda del mechero de bunsen (mantener encendido el mechero 15 minutos antes de iniciar el trabajo).
- Para la desinfección del hongo utilizamos 97ml de suero fisiológico estéril más 3ml de lejía (solución desinfectante al 3%).
- Una vez que tenemos la solución desinfectante en un vaso de precipitado, cerca al mechero de bunsen cortamos el píleo del hongo con un bisturí estéril y colocamos los trozos en la solución desinfectante de 5 a 10 minutos para su desinfección.
- Luego se enjuaga en otro vaso de precipitación con suero fisiológico estéril.
- Finalmente transferimos el hongo a un vaso de precipitado con papel Kraft estéril y dejar orear unos 5 minutos aproximadamente.

5.5.2.3 Siembra, Aislamiento y obtención de ceparios a partir del píleo (sombbrero) de la seta:

- En placas de Petri con el Agar Sabouraud Glucosado modificado para el aislamiento de la seta muestreada, se colocaron tres a cinco trozos de 0.5 a 1 cm del píleo ya desinfectado y oreado.
- Se colocaron las placas en forma invertida para su incubación, es decir, con la tapa hacia abajo en una incubadora refrigerada a 23 °C durante tres a siete días.
- Después de tres días de cultivo los micelios desarrollados, son sembrados con la ayuda de un asa de siembra a otras placas de Petri con el Agar Sabouraud Glucosado con la finalidad de tener una cepa pura.
- Se incubó a 23°C por tres a siete días
- De la cepa pura obtenida se siembra en puntura en 5 tubos de ensayo con el Agar Sabouraud Glucosado en plano inclinado.

- Se incubó a 23 °C por tres a siete días hasta que invade la superficie del agar y,
- Finalmente se guardó en la refrigeradora para su mantenimiento y preservación (CEPARIOS).
- La resiembra de los ceparios se realizó entre 4 a 6 meses para su reactivación, según la recomendación en el Manual Práctico del Cultivo de setas de Rigoberto Gaitán Hernández y colaboradores 2006 (14).

5.5.3 Propagación del Micelio

- De los ceparios se sembró en puntura, con el asa de siembra, sobre la superficie del Agar Sabouraud Glucosado o el Agar Papa dextrosa en placas de Petri (estériles).
- Se incubó de 23 a 25°C o a temperatura ambiente hasta que el micelio invada toda la superficie del medio de cultivo (aproximadamente por 15 días).

5.5.4 Producción de la semilla o blanco

Para la preparación de la semilla o blanco de la seta se realizó según las indicaciones de Magdalena Pavlich Herrera y otros en el 2001 (21) en su trabajo de investigación titulado: “Cultivo de Hongos Nativos del Perú en residuos lignocelulósicos”.

5.5.4.1 Preparación de la cebada o trigo:

- Se lavó la cebada o trigo con abundante agua y luego se escurrió.
- Se realizó un pre cocido de 1 Kg. cebada o trigo en 1.5 a 2 L. de agua, hasta un punto donde no esté sancochado o reventado, aproximadamente 15 minutos. También se puede dejar los granos sumergido en agua durante toda una noche.
- Los granos cocidos o hidratados se escurrieron y se dejaron orear.

- Se mezcló con Carbonato de Calcio (3.5 g por kg. de cebada o trigo cocida o hidratada) con el propósito de disminuir la acidez y servir como fuente de calcio.
- Además, se agregó yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) 13 g por Kg de cebada o trigo cocida o hidratada para que los granos no se peguen unos a otros.
- Se pesaron 100 g de cebada y se colocaron en bolsas de polipropileno N°2 y/o en frascos de vidrio termo resistentes.
- Esterilizar en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

5.5.4.2 Siembra para la producción de la semilla o blanco:

- El micelio propagado en las placas de Petri sobre el Agar Sabouraud glucosado, se corta con un bisturí estéril en pequeños trozos y se sembró sobre la cebada o trigo en cada frasco, en condiciones de asepsia, cerca al mechero de bunsen.
- Se Incubaron a 25°C hasta la invasión del micelio sobre los granos de cebada o trigo lo cual; se logra en 15 a 30 días de incubación.

5.5.5 Elaboración del pre compost a base del gras residual

Considerando los residuos lignocelulósicos de las zonas urbanas es que se decide elaborar sustratos para el cultivo de las setas a base del gras residual con aserrín. Sin embargo, considerando las recomendaciones de otros autores de cultivar los hongos sobre pre compost es que también se elabora el mismo con gras residual de las áreas verdes y estiércol de vacuno y/o caballo.

El gras de la poda de las áreas verdes es principalmente el llamado gras americano, lo cual se obtuvo de la poda de las áreas verdes de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional del Callao en primera instancia. En relación al aserrín, se opta por trabajar con la que proviene de la madera bolaina, ya que hubo facilidades para la

obtención y además debido a que; en conversación con los carpinteros manifestaron que es una madera suave y cuyo árbol es de crecimiento rápido.

Considerando que el proceso de la degradación de la materia orgánica se lleva a cabo en forma óptima cuando la relación C/N se encuentra entre 20 y 35 es que se aplicó la fórmula recomendada por el ITINTEC, en el resumen del curso taller Biodigestores y su aplicación al desarrollo en el año 2002 (7), para calcular la cantidad de materiales a emplear y obtener una relación óptima de C/N para la elaboración de los siguientes sustrato:

Sustrato 1.- Compost del residuo de la poda del gras americano con aserrín de la madera bolaina.

Sustrato 2.- Compost de gras americano sólo.

Además de estos sustratos, con la finalidad de comparar también se ha empleado el compost del residuo de la poda del gras americano con estiércol de ganado vacuno y un compost del residuo de la poda del gras americano con estiércol de caballo.

5.3.5.1.- Fórmula para calcular el balance de carbono de la Carga:

$$CQ=(A.X_A.C_A+B.X_B.C_B)/ 10000$$

CQ= Carbono en la carga total (Kg.)

A= Peso del estiércol o aserrín

X_A= % en peso de sólidos totales del estiércol o aserrín

C_A= % de carbono en peso seco del estiércol o aserrín

B= Peso del residuo de gras

X_B= % en peso de sólidos totales del gras

C_B = % de carbono en peso seco del gras

5.3.5.2.- Fórmula para calcular el balance de nitrógeno de la carga:

$$NQ = (A \cdot X_A \cdot N_A + B \cdot X_B \cdot N_B) / 10000$$

NQ = Nitrógeno de la carga total (Kg.)

N_A = % de nitrógeno en peso seco del estiércol o aserrín

N_B = % de nitrógeno del gras

5.5.5.3.- Relación C/N:

Para hallar el contenido de carbono de la mezcla y el contenido de nitrógeno de la mezcla fue necesario obtener los siguientes datos: sólidos totales, porcentaje de carbono y porcentaje de nitrógeno de las muestras; los sólidos totales se hallaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao mientras que el porcentaje de carbono y/o nitrógeno (%C y %N) del aserrín de la madera bolaina y del gras residual de las áreas verdes del campus de la Universidad Nacional del Callao se enviaron a un laboratorio para su respectivo análisis y, de los demás materiales se consideraron del reporte en el resumen del curso taller Biodigestores y su aplicación al desarrollo en el año 2002 (11).

Para calcular la relación C/N se divide el contenido de carbono de la mezcla entre el contenido de nitrógeno de la mezcla obtenidas con las fórmulas anteriormente señaladas: $CQ/NQ = C/N$.

La relación C/N óptima para el compostaje del sustrato N° 1 fue de 30 y del sustrato N°2 según lo que resulte del análisis; para los sustratos con estiércol de caballo y para los otros sustratos de comparación fue el máximo posible de acuerdo a su relación C/N de los componentes del compost, el cual debe ser entre 20 y 35.

5.5.5.4.- Obtención de porcentaje de sólidos totales del gras y del aserrín:

- Se pesa 100gr. de la muestra
- Dejar en el horno a 105°C por toda una noche o hasta que el peso final se haga constante.
- El peso diferencial nos dará el porcentaje de humedad y el porcentaje de sólidos totales de la muestra

5.5.5.5.- Compostaje:

Una vez determinado las proporciones de los materiales según las fórmulas anteriormente señaladas para obtener una relación C/N óptima de la mezcla se procedió de la siguiente manera:

- El gras residual de tamaño entre 1 a 3 cm se dejó sumergido en agua por todo una noche y luego se dejó orear por unas horas hasta obtener la humedad adecuada (Tomar un puñado y al presionar fuertemente dejar caer de 1 a 2 gotas).
- Se depositó una capa de gras húmedo (altura según el porcentaje hallado) en una bolsa negra y luego una capa del aserrín o el estiércol en forma proporcional, adicionando agua adecuadamente a la segunda capa hasta lograr una humedad óptima y mezclar
- Se formó capas hasta una altura de 1 a 1.5 metros aproximadamente.
- Se hizo algunos agujeros a la bolsa para crear condiciones aerobias y,
- Se midió la temperatura diaria durante dos semanas aproximadamente entre 15 a 20 días.
- El día en que la temperatura descendió hasta la temperatura ambiental se procedió a remover y agregar agua según lo necesario y seguir el proceso de compostaje

5.5.6 Preparación del sustrato para la siembra de las semillas o blanco de la seta y evaluación del cultivo.

De los compost obtenidos se prepararon los sustratos para el cultivo de las setas en bolsas, considerando las recomendaciones de Vásquez Valencia, N. B. en el 2010 (38) sobre la fase II de la fermentación controlada o pasteurización del compost y, además se consideró la adición de fuentes de fosfato para mejorar la digestibilidad de la celulosabasedo en el trabajo de M. Martínez de Acurero y otros en 1993 (17) y las recomendaciones de la Ing. Talledo Rodríguez, Gaby en el 2000 (33) en su trabajo titulado: “Cultivo de Champiñón de Paris en cajas”, en el cual señala la adición de superfosfato para el proceso de fermentación del compost. El procedimiento realizado fue de la siguiente manera:

- Se pesó entre 0.5 a 1 Kg del compost por duplicado en bolsas el sustrato con la humedad apropiada (se cogió un poco de sustrato con la mano y se empuñó hasta sentir la humedad, no debe gotear el agua)
- Se midió el pH neutro, de no ser el caso se le neutraliza.
- Se agregó el superfosfato al 1% o 3% en peso del sustrato y se mezcla con el pre compost.
- Se dejó en la autoclave adecuándola a una temperatura entre 45 a 50 ° C durante 4 días y entre 50 a 60°C durante 3 días. La temperatura se mantuvo sólo durante el día por 8 horas en promedio.
- Se dejó enfriar y, en la mesa de trabajo previamente desinfectada con el mechero de bunsen encendido, se sembró el blanco.
- En cada bolsa se sembró el blanco de 15 a 30 días de cultivo entre 1 a 10% en peso del sustrato.
- Se ubicó en un área previamente desinfectada, en oscuridad, colocando un recipiente con agua para mantener una atmosfera húmeda. Este ambiente se

adecuó debajo de una mesa de concreto del laboratorio de Microbiología con las siguientes dimensiones: 2x1.5x1.20m.

- Se observó periódicamente entre 5 a 7 días de cultivo y se colocó un recipiente con agua caliente para mantener la humedad necesaria.
- Al cabo de unos 14 días, cuando la composta se encuentra bien poblada de micelio de la seta se le aplicó encima la tierra de cobertura (aproximadamente unos 4 cm).

5.5.6.1 De la tierra de cobertura:

Considerando las recomendaciones de Francisco Fernández, Michael en el 2005 (13) en su Manual Práctico de Producción comercial de Champiñón: Apuntes, Recopilación de datos y experiencias adquiridas en el cultivo comercial de champiñones, dónde señala que las funciones de la tierra de cobertura debe de tener los materiales idóneos para el recubrimiento y ofrecer las siguientes características especiales:

- Retención del agua.
- Estructura porosa y suelta, aunque estén mojados.
- Permitir el desarrollo de microflora estimulante.
- Escaso, prácticamente insignificativo poder nutritivo.
- PH. De 7 a 7.5.
- Higiene garantizada (Pacioni 1990).

Es que se utilizó un producto orgánico adquirido de la Universidad Nacional Agraria de la Molina como tierra de cobertura, el cual se preparó de la siguiente manera:

- Se pesó 1 Kg y se le humedeció adecuadamente hasta que al empuñarlo sólo escurre 1 a 2 gotas de agua.
- Se midió el pH y se agregó Carbonato de calcio hasta tener un pH neutro.

- Se desinfectó con vapor de agua en la autoclave por 6 horas a una temperatura de 60-65°C.
- Se dejó enfriar y se utilizó como tierra de cobertura sobre los micelios invadidos en los respectivos sustratos.

5.5.7 Identificación molecular de la seta

Para la identificación a nivel molecular de la seta aislada se realizó con el apoyo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), que en coordinación y aprovechando la oportunidad de que contaban con el kit, es que se decide utilizar el Mini Kit QIAamp, basado en la metodología empleada por Capelari, M y otros en el 2006 (4) para estudiar la afinidad de especies de hongos del género *Agaricus*, para lo cual en dicho laboratorio se realizó la extracción del ADN, la amplificación del ADN por PCR y, el ADN obtenido se envió a un laboratorio extranjero reconocida para que realice la secuenciación del ADN y, finalmente la identificación de la seta se efectuó comparando la secuenciación obtenida con los disponibles en el GenBank.

VI.- RESULTADOS

6.1 Del Muestreo:

Considerando la descripción del *Agaricus campestris* realizado por Pavlich Herrera, Magdalena 2001 (21), por la enciclopedia libre de Wikipedia (10) y de, Ardón López, Carlos Esduardo 2007 (2); se encontraron y se recolectaron del césped de los parques de Lima y Callao muestras de hongos que crecen de manera natural y que corresponden a la descripción del *Agaricus campestris*. Se recolectaron en las áreas verdes de un parque del distrito de los Olivos (véase en el apéndice la fotografía N°6.1 en la página: 88), de San Juan de Miraflores, del camposanto MAFRE Huachipa, del Jardín de la Parroquia Santa María de Huachipa (véase en el apéndice la fotografía N°6.2 en la página: 88), y en el jardín frente a la biblioteca central de la Universidad Nacional del Callao (véase en el apéndice la fotografía N°6.3 en la página: 89); de las cuales sólo se llegó a aislar el hongo recolectado del muestreo en el área verde del distrito de los Olivos y de los otros lugares se contaminaron. En la localidad de Cañete, en las plantaciones de uva después de echar el guano de ganado vacuno y riego por inundación se encontraron hongos macroscópicos con características fenotípica del *Agaricus campestris*, las cuales también se recolectaron debido a que los ejemplares mostraban vitalidad y mejor crecimiento en comparación de los hongos encontrados en los otros lugares mencionados anteriormente, llegando incluso a medir el píleo (sombrero del hongo) un diámetro de 15 cm aproximadamente (véase en el apéndice la fotografía N°6.4 en la página: 89); éste último también fue aislado y se obtuvo los ceparios correspondientes.

6.2 Del Cultivo Puro de la seta muestreada

De los primeros intentos para obtener un cultivo puro de la seta a partir del píleo sobre el agar Sabouraud glucosado no se tuvo éxito en el aislamiento del micelio, por ello es que se decide realizar el aislamiento sobre el agar modificado con extracto del

gras residual como ya se explicó anteriormente en el capítulo de la metodología, del cual se logró obtener cepas de la seta muestreada en el césped de las áreas verdes de los Olivos y de las plantaciones de uva de la localidad de Cañete; con esta última cepa es que se realizaron los siguientes experimentos ya que la aislada de los olivos se perdió en el reactivado. El procedimiento de la desinfección de trozos de carpóforo, la siembra y la obtención de la cepa se puede apreciar en el apéndice (véase en el apéndice las fotografías N° 6.5, 6.6 en la página: 90 y, 6.7 en la página: 91)

6.3 De la propagación del Micelio

De la siembra por puntura sobre el medio de cultivo en las placas de Petri se obtiene la proliferación del micelio a partir de los ceparios, a las 72 horas se obtiene buen crecimiento tanto con el agar Sabouraud glucosado como con el agar modificado con el extracto del gras residual. (Véase en el apéndice las fotografías N° 6.8 en la página: 91).

6.4 De la Producción de la Semilla o Blanco

La producción de la semilla se realizó en frascos de vidrio o en bolsas de plásticos resistentes al calor, de las cuales se obtuvo mejor crecimiento en bolsas, sin embargo cuando los frascos de vidrio son de boca ancha y tapadas con gasa también se obtienen un buen crecimiento. De emplear el trigo o cebada pre cocido o en remojo por toda una noche se obtiene un ligero mejor resultado de las últimas, es decir, hay mejor proliferación del micelio sobre el cereal remojado. La invasión del micelio sobre los granos de cebada o sobre los granos de trigo se desarrolla adecuadamente, es decir en ambos casos se desarrollan bien sin mostrar diferencias significativas; sin embargo en algunas oportunidades el crecimiento sobre los granos de trigo el crecimiento fue pobre, observándose incluso crecimiento alejada a los granos sobre las paredes de la bolsa. Los micelios proliferados sobre los granos se aprecia en el apéndice (Véase en el apéndice las fotografías N° 6.9 en la página 92, y 6.10 y 6.11 en la página: 93)

6.5 De la elaboración del Pre compost a base del gras residual

Para determinar el %C y %N tanto del aserrín como del gras se envió las muestras al laboratorio de Análisis de Suelo, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria de la Molina, y los % en peso de sólidos totales del aserrín y del gras se determinó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao; los cuales se encuentran en el apéndice (véase en apéndice la Tabla N° 6.1 en la página: 104)

Con éstos datos obtenidos aplicamos las fórmulas correspondientes para determinar el porcentaje del gras residual y el porcentaje del aserrín que nos permita obtener una relación C/N igual a 30:

$$\text{Para el carbono: } CQ = \frac{(A)(82,26)(56,68) + (B)(30,62)(44,75)}{10000}$$

$$\text{Para el nitrógeno: } NQ = \frac{(A)(82,26)(0,94) + (B)(30,62)(1,82)}{10000}$$

Considerando que C/N=30:

$$30 = \frac{(A)4662,4968 + (B)1370,245}{(A)77,324 + (B)55,728}$$

$$2342,4648A = 301,607B \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{Si: } A + B = 100\% \dots \dots (2)$$

REEMPLAZAR (2) EN (1) Y SE OBTIENE:

$$A = 11,41 \% \text{ (Peso del Aserrín)}$$

$$B = 88,59\% \text{ (Peso del gras)}$$

Por consiguiente procedemos a mezclar 88,59% de gras con 11,41% de aserrín para obtener el sustrato N°1 y el resultado de la evaluación de las temperaturas diaria del

proceso del compostaje se muestra en apéndice el cual fue evaluado durante 14 días resultando 36.3 como temperatura máxima (véase en el apéndice el gráfico N° 6.1 en la página: 105)

Para el sustrato N°2, considerando los resultados del %C y %N del gras residual obtenido del laboratorio de Análisis de Suelo, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria de la Molina, su relación C/N sería igual a 24.587, y el proceso de compostaje se realizó en 18 días y se llegó a 45.7 como temperatura máxima; el resultado de la evaluación de la temperatura durante el proceso del compostaje se aprecia en el apéndice (véase en el apéndice el gráfico N° 6.2 en la página: 105)

En algunos experimentos se preparó compost a base de gras residual con estiércol de caballo o con estiércol de ganado vacuno con fines de comparación, para lo cual se utilizó los datos obtenidos del resumen del curso taller Biodigestores y su aplicación al desarrollo en el año 2002 presentado en anexos (véase en el anexo la Tabla N° 6.1 en la página: 110)

Con éstos datos y aplicando las fórmulas correspondientes se determina que para obtener una relación C/N igual a 23 se debe mezclar 21.11% de gras residual con 78.89% de estiércol de vacuno y; 98.46 % del gras residual con 1.34% de estiércol de caballo. En el apéndice se aprecia la evaluación de la temperatura durante el proceso del compostaje del gras con el estiércol de vacuno (véase en el apéndice el gráfico N° 6.3 en la página: 106).

Además, nos proporcionaron una muestra de residuos de la extracción de la esencia del maíz morado, es decir un residuo que contenía la coronta triturada y la cascarilla del maíz, el cual también lo enviamos al laboratorio de Análisis de Suelo, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria de la Molina para obtener el %C y %N y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao se

determinó el porcentaje de humedad y sólidos totales; estos datos se muestran en el apéndice (véase en el apéndice la Tabla N° 6.2 en la página: 104) del cual se puede determinar que la relación C/N es de 39.748 y se utilizó como sustrato para el cultivo de la seta directamente después de conservarlo durante 30 días aproximadamente en refrigeración.

6.6 Del Cultivo de la seta hasta el Fructificado:

Se han realizado cuatro intentos para lograr el fructificado de las setas, de las cuales explicaremos los detalles que resultaron en cada experiencia:

6.6.1 Primera experiencia sobre el cultivo de la seta:

El proceso de cultivo se llevó a cabo del 17 de Octubre al 17 de Noviembre del 2012, el cual se realizó sobre 1.5 Kg de los pre compost obtenidos anteriormente en bolsas de polipropileno N°2: 3 bolsas de pre compost de gras y 3 bolsas de pre compost de la mezcla de gras con aserrín; dos bolsa de cada sustrato fueron esterilizados en el autoclave a 121°C, 15Lb de presión por 15 minutos y las otras dos bolsas fueron pasteurizadas a 75 °C en el autoclave por una hora; después del enfriado en un área aséptica, cerca del mechero, se sembró 1.5 gr del blanco o semilla (inóculo al 10%) sobre los respectivos sustratos (véase en el apéndice la fotografía N° 6.12 en la página: 94). Esta metodología del cultivo en bolsas es siguiendo el procedimiento de cultivo para las setas ostras *Pleurotus ostreatus* y; los resultados observados durante el cultivo fueron las siguientes:

- En los cinco primeros días incubados a 25°C se observó un crecimiento del micelio sobre los sustratos pero generando un olor putrefacto razón por el cual se procedió a realizar agujeros en la bolsa para colocarlo en un área adecuada a temperatura ambiente.
- Después de colocarlo a temperatura ambiente y realizar los agujeros a las bolsas, el crecimiento del micelio mejoró ligeramente.

- En el día 10 del cultivo se observa crecimiento algodonoso, ligeramente mejor en los sustratos pasteurizados en relación a los sustratos esterilizados (véase en el apéndice la fotografía N° 6.13 en la página: 94)
- En el día 22 los micelios se tornaron amarillentas, razón por la cual se procedió a abrir las bolsas con la finalidad de mejorar las condiciones para una mejor invasión del micelio (véase en el apéndice las fotografías N° 6.14 y 6.15 en la página: 95)
- En el día 30 se observa que el crecimiento se había detenido e invadido de larvas de moscas, lo cual motivó a desecharlos (véase en el apéndice la fotografía N° 6.16 en la página: 96)

6.6.2 Segunda experiencia sobre el cultivo de las setas:

Para ésta segunda experiencia se realizó el cultivo de las setas en el mes de enero del 2013, sobre los siguientes sustratos: Pre compost de tres semanas de gras residual, de gras residual con aserrín de madera bolaina y, pre compost de gras con estiércol de caballo. Se preparó 2 bolsas de 1.5 Kg para cada sustrato, los cuales fueron pasteurizados a 75°C por una hora en base a los resultados de la primera experiencia donde el micelio se desarrolló mejor sobre sustratos pasteurizados que sobre sustratos esterilizados; las observaciones durante el periodo del cultivo fueron:

- Los dos primeros días se colocaron en una incubadora a 25 ° C y se procedió a realizar agujeros a las bolsas y dejarlo en un área adecuado a temperatura ambiente.
- En el día cuatro de cultivo se observa crecimiento algodonoso, y si comparamos con los resultados de la primera experiencia se puede apreciar ligeramente mejor sobre los tres sustratos y; si comparamos entre los tres sustratos se aprecia mejor crecimiento sobre el pre compost de aserrín con gras (Véase en el apéndice la fotografía N° 6.17 en la página: 96)

- En el día 13 se observó el crecimiento de un estípite (pie) de la seta sembrado en el pre compost de gras, Sin embargo, hay que dejar en claro que la estructura fructificada no mostraba vigorosidad, es decir, era un crecimiento débil y que finalmente mostró un carpóforo pequeño y atrofiado(Véase en el apéndice la fotografía N° 6.18 en la página: 97)
- En el día 15 se observa que el crecimiento se había detenido y empezó a secarse.
- Este resultado se debió a que el mes de enero y todo el verano del 2013 fue muy caluroso, tal es así que los medios de comunicación local informaban temperaturas ambientales de hasta 31°C y, para sustentar dicho reporte se puede apreciar en anexos las temperaturas registradas y reportadas por TheWeaterChannel para Lima Callao de los meses de enero y febrero del 2013(Véase en el anexo la Tabla N° 6.2 en las páginas: 111 y 112)

6.6.3 Tercera experiencia sobre el cultivo de las setas:

Para ésta tercera experiencia se realiza en un ambiente adecuado en el local de la sede Cañete de la Universidad Nacional del Callao del 26 Abril al 31 Mayo del 2013, en el Coliseo ubicado en San Vicente de Cañete y, el sustrato elaborado para el cultivo fue a base del gras residual con aserrín adquiridas de la localidad; el sustrato fue compost de 4 semanas, pasteurizado e inoculado en bolsas como en las experiencias anteriores, pero desde el inicio se le mantuvo a temperatura ambiente; además considerando que en las dos experiencias anteriores no se tuvo éxito en el fructificado es que, se decide realizar el cultivo según la metodología para el *Agaricusbisporus* y no según el método para el *Pleurotusostreatus* como en las dos primeras experiencias; por ello los dos primeros días las bolsas estuvieron cerradas y luego totalmente abiertas, con la finalidad de utilizar tierra de cobertura en cuanto el micelio invada totalmente el sustrato. Durante el periodo de cultivo se registraron una temperatura promedio de 22.2 °C; las temperaturas ambientales durante el cultivo fueron registrados por día

(véase en el apéndice la tabla N° 6.3 en la página: 104) y se realizaron las siguientes observaciones:

- En la primera semana del cultivo se observa en la superficie abundante crecimiento algodonoso en todas las bolsas sembradas. La invasión del micelio sobre el sustrato se llevó a cabo en dos semanas(véase en el apéndice la fotografía N° 6.19 en la página: 98)
- En el día 15de cultivo con el objetivo de inducir el fructificado de las setas es que se prepara como cobertura gras fresco picado previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos, el cual es colocado una capa sobre los micelios en desarrollo en todas las bolsas.Se utilizó éste material de cobertura debido a que en el momento oportuno no se tenía otro material orgánico apropiado.
- En el día 21 del cultivo se observa que los micelios invadieron la capa de gras que hacía de cobertura(Véase en el apéndice la fotografía N°6.20 en la página: 98).
- En el día 28 del cultivo, muchos insectos invadieron nuestro cultivo e incluso nos invadieron roedores que prácticamente destruyeron todo el cultivo y en consecuencia un fracaso en el fructificado de la seta(Véase en el apéndice la fotografía N°6.21 en la página: 99).

6.6.4 Cuarta experiencia sobre el cultivo de las setas:

En ésta cuarta experiencia se empleó pre compost de 15 a 20 días de fermentación como sustratos para el cultivo de la seta: gras con aserrín de la madera bolaina, gras con estiércol de vacuno, gras con estiércol de caballo y; además se utilizó el residuo de la extracción de esencias del maíz morado y compost comercial (de estiércol de vacuno) adquirida del centro comercial MINKA; los cuales fueron inoculadas el 4 de Junio del 2013 en bolsas y colocadas en un ambiente limpio pero en ésta ocasión, las bolsas durante las primeras 24 horas estuvieron cerrados y luego

se mantuvieron abiertas a temperatura ambiente, el cual en promedio fue de 20°C durante el tiempo del cultivo y, se obtuvo como resultado lo siguiente:

- En la primera semana del cultivo se observa en la superficie abundante crecimiento algodonoso sobre el sustrato de residuos del maíz morado, el compost comercial, sobre el compost de gras con estiércol de vacuno y, en el compost de gras con estiércol de caballo mientras que en el sustrato de compost de gras con aserrín el crecimiento fue menor.
- El 20 de Junio, el día 16 de cultivo, en todos los sustratos el micelio se observa con una tendencia al secado por ello hemos adquirido un producto llamado abono orgánico de la Universidad Nacional Agraria de la Molina, para utilizarlo como tierra de cobertura tal como se recomienda para el cultivo de los champiñones, cuya función de esta capa es la de inducir la formación de primordios y la de proveer agua al hongo en el momento del desarrollo. Además, considerando las características que debe tener la tierra de cobertura para inducir el fructificado es que decidimos emplear el producto previamente humedecida por toda una noche, escurrida, oreada y pasteurizada con vapores de agua por una hora. También recomiendan para la inducción del fructificado de las setas hacer pasar por shock térmico al micelio, razón por el cual se procedió a colocar las bolsas de cultivo a una temperatura promedio de 8°C por toda una noche, previo a la colocación de la tierra de cobertura.
- Con la capa de tierra de cobertura no se logró el objetivo de recuperar el crecimiento del micelio y menos la fructificación, presentándose incluso invasión de insectos en el día 20 del cultivo.

La evolución de la invasión del micelio sobre los diferentes sustratos empleados se puede apreciar en el apéndice; sobre el compost de gras con estiércol de vacuno (véase en el apéndice la fotografía N° 6.22 en la página: 100); sobre el compost de gras con estiércol de caballo (véase en el apéndice la fotografía N° 6.23 en la página:

101); sobre el compost de gras con el aserrín de la madera bolaina (véase en el apéndice la fotografía N° 6.24 en la página: 102) y; sobre el sustrato de residuos del maíz morado y sobre el compost comercial (véase en el apéndice la fotografía N° 6.25 en la página: 103).

6.7 De la Identificación a nivel molecular

En el Laboratorio de Biología y Genética molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se efectuó en tres oportunidades la extracción del ADN de la cepa de hongo aislado, con resultados negativos para la extracción del ADN en las dos primeras y por ello en la tercera oportunidad se combina el uso del nitrógeno líquido para la extracción de ADN y seguido para la obtención del ADN con el kit DNeasyPlant Mini (Qiagen) (véase en el apéndice el informe 01 del laboratorio de Biología y Genética molecular de la Facultad de Medicina veterinaria de la UNMSM en las páginas: 113, 114, 115, 116 y, 117).

VII.- DISCUSIÓN

7.1.-Las setas que se han recolectado para su aislamiento fueron aquellas de píleo ancho, convexo, expandido, blanco homogéneo a blanco sucio, liso ligeramente escamoso o fibroso, de 4 a 15 cm de ancho, con manchas de color parduzco; lamelas numerosas de color pálido cuando jóvenes a marrón con la edad; estípites blanco liso, cilíndrico de 3 a 5 cm de longitud y de 1 a 2 cm de ancho; estas características fenotípicas corresponden al *Agaricus campestris* descritas también en el Perú por Pavlich Herrera, Magdalena en el año 2001(21).

7.2.-Para realizar el aislamiento de una cepa de seta comestible se emplea las esporas o una parte de la estructura fructificada, es decir, a partir de las esporas del hongo o a partir del carpóforo; en el presente trabajo se obtuvo a partir del carpóforo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Ríos Ruíz, Rolando y otros (1993) (27), quienes señalaron el aislamiento de una seta comestible de la selva de Tingo María (Huánuco-Perú): el mayor promedio de desarrollo micelial se consigue a partir del aislamiento y cultivo del carpóforo del hongo previamente desinfectada. El aislamiento de las cepas de las setas muestreadas fue más efectiva utilizando el agar Sabouraud glucosado modificado, el extracto del gras residual le provee nutrientes complementarios al Sabouraud glucosado comercial que promueve el crecimiento del *Agaricus campestris* y permite un aislamiento más eficiente.

Se aislaron dos cepas de setas, una desde el carpóforo recolectada del área verde del distrito de los Olivos y otra de una muestra recolectada de suelo de cultivo de Cañete y; se decidió emplear éste último para los trabajos de cultivo sobre los sustratos de pre compost a base del gras residual, debido principalmente a que; las muestras eran más grandes con carpóforo carnosa y además considerando los aportes de Talledo Rodríguez, Gaby (2008) (32) y de Ardón López, Carlos (2007) (2), en el sentido que;

ambos coinciden que las setas silvestres que crecen junto a carreteras, jardines públicos, minas, fundiciones, aeropuertos e incineradores suelen contener metales pesados como plomo, mercurio, cobre y cadmio, que con una simple limpieza no se eliminan y su consumo puede ser perjudicial por su toxicidad. En el área verde del distrito de los Olivos donde se llevó a cabo el muestreo de la seta, existen actividades que contaminan el ambiente, por ejemplo la gran cantidad de automóviles que circulan, mientras que en la zona agrícola de Cañete las actividades de contaminación son mínimas.

7.3.- La propagación del micelio de la cepa aislada se desarrollaron en forma óptima tanto en el agar Sabouraud glucosado, agar papa dextrosa y en el agar modificado con el extracto del gras residual, en concordancia a otros autores tales como Francisco Fernández, Michael (2005) (13); Gaitán Hernández, Rigoberto y otros (2006) (14) y; Pavlich Herrera, Magdalena (2001) (21); quienes recomiendan para el cultivo micelial de los hongos comestibles los medios comunes y comerciales para hongos,

7.4.- En la elaboración de la semilla o blanco del *Agaricuscampestris* se utilizó granos de cebada y/o trigo esterilizados, previamente sancochadas o remojadas durante toda una noche, éstas últimas permitieron un mejor desarrollo de los micelios, es decir, dejando hidratar los granos por toda una noche es mejor que sancocharlas. Se prepararon en botellas y bolsas y, se incubaron en oscuridad a una temperatura de 25°C, lográndose mejor desarrollo micelial cuando había más espacio, es decir, más ventilación en el recipiente de cultivo sea bolsa o botella; en relación a la temperatura de incubación y la condición de oscuridad se apoya una de las conclusiones de Ríos Ruíz, Rolando y otros (1993) (27); quienes al cultivar una seta *Pleorotusostreatus* de Tingo María señalaron que hay mejor desarrollo micelial sobre trigo autoclavado, cuando se cultiva en oscuridad entre 25°C a 29°C. Sin embargo, es oportuno señalar que en dos oportunidades, la producción del blanco sobre trigo no fue lo óptimo, observándose incluso desarrollo micelial sobre las paredes de la bolsa como tratándose de alejar de los granos de trigo; este comportamiento puede deberse a

contaminación con plaguicidas y/u otras sustancias ya que este producto es importado en su mayoría en nuestro mercado local, motivo por el cual optamos trabajar con cebada de origen de la sierra peruana por las referencias de ser cultivado de forma natural.

7.5.- De la elaboración del pre compost, considerando las proporciones de las materias primas calculadas según relación C/N con las fórmulas recomendadas por el ITINTEC (2002) (11) y según las temperaturas registradas durante el proceso fermentativo, se llevó a cabo de forma óptima sin generar olores desagradables.

7.6.- Del cultivo de la cepa aislada correspondiente a *Agaricuscampestris* sobre los sustratos a base del gras residual, en las condiciones ambientales del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao; en la primera experiencia podemos corroborar que; el crecimiento micelial mejoró cuando hay una mejor ventilación, además se observó que el crecimiento del micelio es mejor cuando se emplea el sustrato pasteurizado a utilizar el sustrato esterilizado y; en la segunda experiencia, en base a la primera experiencia, se logró una mejor invasión del micelio sobre los sustratos de pre compost a base del gras residual, llegando incluso a fructificar el hongo, aunque atrofiado y sólo escasamente dos (2) muestras; éstas dos experiencias se realizaron según el procedimiento de cultivo del *Pleurotusostreatus*, en bolsas agujereadas para que el hongo fructifique sin la necesidad de agregar capas de cobertura. Para la tercera y cuarta experiencia, considerando que una buena ventilación mejora la invasión del micelio sobre los sustratos a base del gras residual, se cultivó según el procedimiento de cultivo de champiñones (*Agaricusbisporus*), en bolsas abiertas y con capa de cobertura para inducir el fructificado del hongo; lográndose en la tercera experiencia una mejor invasión del micelio pero los insectos y finalmente los roedores perjudicaron el cultivo, en la cuarta experiencia, también se logró el crecimiento e invasión del micelio sobre los sustratos a base del gras residual y

además sobre un compost comercial y sobre un residuo de la extracción de esencia del maíz morado, pero en ninguno de los casos se logró la fructificación ansiada.

Para lograr el fructificado de una seta existe una serie de factores que inducen al mismo, tales como el clima exterior, el contenido de humedad, la diferencia de concentración del CO₂ entre el sustrato y el aire del ambiente, el microclima que le provee la tierra de cobertura y el tipo de cepa. El *Agaricus campestris*, ha sido reportado por varios autores como hongos comestibles, sin embargo no se ha encontrado trabajos de investigación sobre los procedimientos de su cultivo, es decir, han sido consumidos por cierta población humana de la recolección más no han sido cultivadas; ésta situación complicó llegar al objetivo del presente trabajo, además para realizar el cultivo de la cepa aislada sobre los sustratos a base del gras residual, no se contaron con el equipamiento apropiado para monitorear la humedad y la concentración de CO₂ complicando aún más la situación. Francisco Fernández, Michael en el 2005 (13), por ejemplo, resalta la importancia de la concentración de CO₂ para el fructificado del champiñón, señalando que la formación de primordios tiene lugar en un 0.1 a 0.2% de CO₂, dependiendo de la especie, además indica que las especies de *Agaricus bitorquis* forman granos a concentraciones de CO₂ más elevadas; además manifiesta que la tierra de cobertura debe contener ciertas bacterias como *Pseudomonas putida* que son responsables de la fructificación del champiñón; todo ello nos muestra que es difícil obtener una fructificación satisfactoria, por desconocimiento de los tratamientos a aplicarse en el momento oportuno. Las condiciones climáticas en las que se realizaron los experimentos del cultivo han sido las adecuadas, ya que el desarrollo micelial logrado sobre los diferentes sustratos a base del gras residual así lo demuestran, principalmente por la humedad y la temperatura en la Provincia Constitucional del Callao; al respecto como referencia Medina Ciudad R. en el 2003 (19) concluye que la temperatura de 28.5°C y 76% de humedad relativa permiten fácilmente adecuar a los requerimientos de *Agaricus blazei* para su desarrollo.

7.7.- La identificación a nivel molecular de la cepa aislada se realizó con el apoyo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para lo cual se les facilitó cultivos del micelio en tubos de ensayo con el agar papa dextrosa; se realizó dos intentos fallidos en la extracción del ADN del hongo pero en la tercera oportunidad nos informaron que iban a combinar el uso del nitrógeno líquido para la extracción de ADN y seguido para la obtención del ADN con el kit DNeasyPlant Mini (Qiagen), el cual también fue utilizado por Capelari, M y otros en el año 2006 para la identificación del Género *Agaricus*. Finalmente, según las características fenotípicas de la muestra del hongo y, con el informe del laboratorio de Biología y Genética molecular de la UNMSM se demostró a nivel molecularmente que la cepa aislada según el Análisis filogenético de la secuencia 5,8S ribosómico le corresponde a la especie *Agaricus campestris* con un 99.9% de identidad para la secuencia analizada.

Por todo lo que precede podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha logrado el aislamiento de una cepa que fenotípicamente y molecularmente le corresponde al *Agaricus campestris* a partir de trozos de carpóforo previamente desinfectadas y cultivadas sobre el Agar Sabouraud glucosado modificado e incubado entre 23 a 25°C y a temperatura ambiente.
2. Se ha logrado obtener mejores semillas o blanco sobre granos de cebada o trigo hidratados por toda una noche, cuando fueron depositados en espacios amplios, ventilados e incubadas a 25°C y también a temperatura ambiente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Callao.
3. Se ha logrado el crecimiento e invasión del micelio de la cepa aislada, sobre los diferentes sustratos de pre compost a base del gras residual de las áreas verdes de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Callao en las condiciones climáticas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de

Ingeniería Ambiental y de Recursos Naturales, pero no se llegó hasta el fructificado del hongo, lo cual no permitió la evaluación a través de la eficiencia biológica.

4. En relación a la identificación de la cepa aislada; según las características fenotípicas de la muestra del hongo y, de acuerdo con el informe del laboratorio de Biología y Genética molecular de la UNMSM, se demostró a nivel molecular según el Análisis filogenético de la secuencia 5,8S ribosómico que; le corresponde a la especie *Agaricus campestris* con un 99.9% de identidad para la secuencia analizada.

Y señalar las siguientes recomendaciones:

1. Teniendo en cuenta la demanda creciente de los hongos comestibles, continuar con la investigación hasta lograr el fructificado de la cepa de hongo aislado y, analizar sus propiedades nutritivas.
2. Realizar el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre sustratos a base del gras residual de la poda de las áreas verdes.
3. Investigar las técnicas que permitan recuperar los metales pesados utilizando los macro hongos, como la cepa aislada en el presente trabajo.
4. Considerar las muestras de las setas que se desarrollan en los jardines de las áreas verdes como bioindicadores de la contaminación por metales pesados.
5. Experimentar con la cepa del hongo aislado en interacción con el césped para los trabajos de biorremediación de suelos contaminados.

VIII.- REFERENCIALES

- 1) ANDINA AGENCIA PERUANA DE NOTICIAS. **Campesinos de Cajamarca y Lambayeque producen más de 500 kilos mensuales de hongos comestibles.** Disponible en: <http://www.andina.com.pe/espanol/Noticia.aspx?id=zHQ11hStPYk=#.UqiyuvTuKBI> . Artículo web consultado el 10 de Diciembre del 2013.
- 2) ARDÓN LÓPEZ, CARLOS ESDUARDO. **La producción de los Hongos Comestibles.** Disponible en: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2043/07_1932.pdf. Artículo web consultado el 1 de Setiembre del 2012.
- 3) BURROLA AGUILAR, CRISTINA; GARIBAY ORIJEL, ROBERTO Y; HERNÁNDEZ TÉLLEZ, MARIVEL. **El Conocimiento Tradicional en el Aprovechamiento de los Hongos Comestibles Silvestres.** Disponible en: <http://uaim.edu.mx/anca/Documentos/CD/MemoriasCongresoANCA2012.pdf> . Artículo web consultado el 30 de Enero del 2013.
- 4) CAPELARI, M., ROSA, L.H. AND LACHANCE, M.A. **Description and affinities of *Agaricus martineziensis*, a rare species.** Disponible en: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/21-2.pdf> . Artículo web consultado el 3 de Mayo del 2013.
- 5) CINTIA ELIZABETH PAISIO, PAOLA SOLANGE GONZALES, MELINA ANDREA TALANO Y ELIZABETH AGOSTINI. **Remediación Biológica de Mercurio: Recientes avances.** Disponible en: http://www3.inecol.edu.mx/solabiaa/ARCHIVOS/documentos/relbaa/paisio_e tal_rev_latinoam_biotec_amb_algal_v3n2.pdf. Artículo web consultado el 13 de Diciembre del 2013.

- 6) COMUNIDAD CAMPESINA SAN ISIDRO LABRADOR DE MARAYHUACA, INCAHUASI, REGIÓN LAMBAYEQUE-PERÚ. **Industrialización de Hongos comestibles Silvestres.** Disponible en: <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/peru/UdeG/INDEX.htm>: Artículo web consultado el 10 de Diciembre del 2013.
- 7) EL COMERCIO. **Comunidad Campesina de Marayhuaca comercializa hongos comestibles.** Disponible en: <http://elcomercio.pe/edicionimpresa/html/2008-01-17/comunidad-campesina-marayhuaca-comercializa-hongos-comestibles.html>. Artículo web consultado el 10 de Diciembre del 2013.
- 8) EL COMERCIO. **Panetón con frutilla de aguaymanto será presentado en Mistura.** Disponible en: <http://elcomercio.pe/gastronomia/1461973/noticia-paneton-frutilla-aguaymanto-presentado-mistura>. Artículo web consultado el 10 de Diciembre 2013.
- 9) EL COMERCIO. **Panetones con harina de hongos: un proyecto de la comunidad de Marayhuaca que da frutos.** Disponible en: <http://elcomercio.pe/peru/682132/noticia-panetones-harina-hongos-proyecto-comunidad-marayhuaca-que-da-frutos>. Artículo web consultado el 10 de Diciembre del 2013.
- 10) ENCICLOPEDIA LIBRE WIKIPEDIA. **Agaricus campestris.** Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Agaricus_campestris. Artículo web consultado el 22 de Febrero del 2012.
- 11) ENERGÍA, DESARROLLO Y VIDA; UNI; BIOAGRICULTURA CASA BLANCA. **Resumen del Curso taller. Biodigestores y su aplicación al desarrollo.** Lima-Perú. Auspiciado por CONCYTEC, Abril del 2 002.
- 12) FLORES ARZÚ R, COMANDINI O, RINALDI A.C. **A preliminary checklist of macro fungi of Guatemala, with notes on edibility and traditional knowledge.** Mycosphere. Disponible en:

http://mycosphere.org/pdfs/MC3_1_No1.pdf. Artículo web consultado el 7 de Noviembre del 2012.

- 13) FRANCISCO FERNANDEZ, MICHAEL. **Manual práctico de producción comercial de Champiñón: Apuntes, Recopilación de datos y experiencias adquiridas en el cultivo comercial de champiñones.** Guadalajara, Jalisco-México. 2005.
- 14) GAITAN HERNANDEZ, RIGOBERTO; SALMONES, DULCE; PEREZ MERLO, ROSALIA y; MATA, GERARDO. **Manual Práctico del Cultivo de Setas: Aislamiento, siembra y producción.** Xalapa, Veracruz-México; Instituto de Ecología, A.C., Primera edición, segunda reimpresión. 2006.
- 15) LA PRIMERA. **Fomentan cultivo de Hongos Comestibles en Cajamarca.** Disponible en: http://www.diariolaprimeraperu.com/online/nacional/fomentan-cultivo-de-hongo-comestible-en-cajamarca_108546.html. Artículo web consultado el 10 de Diciembre del 2013.
- 16) MANZANILLA ERIKA y, VICHI JUAN. **Biodiversidad de Hongos Macroscópicos de la Universidad de Quintana Roo, campus Chetumal.** Disponible en: <http://uaim.edu.mx/anca/Documentos/CD/MemoriasCongresoANCA2012.pdf>. Artículo web consultado el 30 de Enero del 2013.
- 17) MARTINEZ DE ACURERO, M.; E. CAPÓ; C.F. CHICCO, GODOY DE LEON; G. ACURERO y; H. QUINTANA. **Digestibilidad in vitro de la celulosa utilizando diferentes fuentes de fosforo.** Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt1101/texto/digestibilidad.htm. Artículo web consultado el 14 de Mayo del 2013.
- 18) MARTÍNEZ PEÑA, FERNANDO. **Producción de Carpóforos de Macromicetes epigeos en Masas Ordenadas de *Pinussylvestris* L.** Disponible en: http://oa.upm.es/1816/2/FERNANDO_MART%C3%8DNEZ_PENA.pdf. Artí

culo webconsultado el 6 de Noviembre del 2013.

- 19) MEDINA CIUDAD, R. **Evaluación, comportamiento y Producción del hongo del sol Agaricus blazei Murril, en Tumbes.** Tesis para optar el título de ingeniero Agrónomo. Tumbes-Perú. Universidad Nacional de Tumbes; Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 2003.
- 20) ORTIZ MORENO, MARTHA L. **Macromicetos en Zona Rural de Villavicencio.** Disponible en: <http://www.freefullpdf.com/#gsc.tab=0&gsc.q=macromicetos%20biorremedias&gsc.sort=>. Artículo web consultado el 14 de Diciembre del 2013.
- 21) PAVLICH HERRERA, MAGDALENA y, otros. **Cultivo de Hongos Comestibles Nativos del Perú en Residuos Lignocelulósicos.** BIOTA Revista de Ciencias Biológicas. XVIII (100). Pp. 20 al 32. 2001
- 22) PAVLICH HERRERA, MAGDALENA. **Los Hongos comestibles del Perú.** Biota Revista de Ciencias Biológicas. XVIII (100). Pp.:3-16. 2001.
- 23) PERDOMO ZIEMS, H. M. **Caracterización Fenotípica y Molecular de Hongos Filamentosos Oportunistas: Scedosporium, Acremonium, Phialemonium, Lecythophora y Paecilomyces.** Disponible en: <file:///C:/Users/Carlos%20Tome/Downloads/Haybrig%20Perdomo%20tesis.pdf>. Artículo web consultado el 8 de Octubre del 2014.
- 24) PRESCOTT, HARLEY y KLEIN. **Microbiología.** España. Editorial McGraw-Hill-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. Séptima edición. 2009.
- 25) QUIÑÓNEZ MARTÍNEZ, MIROSLAVA; ENRIQUEZ ANCHONDO, IRMA; LEKGUE KELENG, TOUTCHA; BERNAL CARRILLO, SUSANA Y; LAVÍN MURCIO, PABLO. **Conocimiento Científico Actual de los Hongos Macromicetos de los Bosques de Chihuahua.** Disponible en: <http://uaim.edu.mx/anca/Documentos/CD/MemoriasCongresoANCA2012.pdf>. Artículo web consultado el 30 de Enero del 2013.

- 26) RAMON SANS FONFRIA y JOAN DE PABLO RIBAS. **Ingeniería Ambiental: Contaminación y Tratamientos**. Colombia. Editorial ALFAOMEGA GRUPO EDITOR, S.A. de C.V. 1999.
- 27) RÍOS RUÍZ, ROLANDO A. Y RUIZ RENGIFO, LADISLAO. **Aislamiento y Cultivo del Hongo Comestible *Pleurotus* afin *ostreatus* (jacq. ex fr) kumm en Tingo María**. Disponible en: http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia5_articulo1.pdf. Artículo web consultado el 7 de Noviembre del 2013.
- 28) RONALD M. ATLAS y RICHARD BARTHA. **Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental**. España. Editorial PEARSON EDUCACION S.A. Cuarta edición 2008. Pp.: 227
- 29) SIERRA GALVÁN, SIGFRIDO. **Los Hongos Comestibles y su Cultivo: Historia, Desarrollo Actual y Perspectivas en México y el Mundo**. Disponible en: <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~germoplasma/files/s6/Sierra%20Galvan.pdf>. Artículo web consultado el 26 de Agosto del 2012.
- 30) SUAREZ ARANGO, CAROLINA Y JEANNETTE NIETO, IVONNE. **Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos**. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2013-30/001008.pdf>. Artículo web consultado el 12 de Diciembre del 2013.
- 31) SUAREZ ARANGO, CAROLINA. **Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional**. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8989/1/01107463.2012.pdf>. Artículo web consultado el 12 de Diciembre del 2013.

- 32) TALLEDO RODRÍGUEZ, GABY A. **Evaluación de la capacidad de bioacumulación de metales pesados (Pb, Cd, Cu y Hg) en dos especies de hongos: *Agaricusbisporus* y *Agaricusbrunnencens*, durante su periodo vegetativo.** Tesis para optar el grado de Mag.Sc. Lima-Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina; Escuela de Post Grado; Especialidad de Ciencias Ambientales. 2008.
- 33) TALLEDO RODRÍGUEZ, GABY. **Cultivo de Champiñón de Paris en cajas.** Agro Enfoque, Revista para el desarrollo Agropecuario, Agroindustrial y Agro exportación. Edición (112). Pp.: 45,46. 2000.
- 34) TALLEDO RODRÍGUEZ, GABY. **Las Setas una Alternativa.** Agro Enfoque, Revista para el desarrollo Agropecuario, Agroindustrial y Agro exportación. XIII (91). Pp.: 16 al 18. 1 997.
- 35) TALLEDO RODRÍGUEZ, GABY. **Los Champiñones.** Agro Enfoque, Revista para el desarrollo Agropecuario, Agroindustrial y Agro exportación. XVIII (139). Pp.: 22 al 24. 2003.
- 36) TALLEDO RODRÍGUEZ, GABY. **Los Hongos y Setas comestibles en el antiguo Perú.** Agro Enfoque, Revista para el desarrollo Agropecuario, Agroindustrial y Agro exportación, XII (92). Pp. 49 al 51. 1 998.
- 37) TOME RAMOS, CARLOS. **Estudio de Adaptabilidad y fructificación del champiñón (*Agaricus bisporus*) sobre gras residual de la Universidad Nacional del Callao.** Informe final de investigación en la FIARN/UNAC. Callao-Perú, 2 007
- 38) VÁSQUEZ VALENCIA, N. V. **Proceso del Cultivo de Champiñones.** Trabajo monográfico para optar el título profesional de Ing. Agrónomo. Lima-Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina; Facultad de Agronomía. 2010.

IX.- APÉNDICE

FOTOGRAFÍA N°6.1

ÁREA VERDE DEL DISTRITO DE LOS OLIVOS DE LIMA DONDE SE LLEVÓ A CABO EL MUESTREO DE SETAS CON CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE *Agaricus campestris* EN SETIEMBRE DEL 2011.



FOTOGRAFÍA N°6.2

SETA DESARROLLANDO DE FORMA NATURAL EN EL CÉSPED DEL JARDÍN DE LA PARROQUIA DE SANTA MARÍA DE HUACHIPALURIGANCHO LIMA EN MAYO DEL 2012



FOTOGRAFÍA N°6.3

SETA EN EL CÉSPED DEL JARDÍN UBICADO FRENTE A LA BIBLIOTECA
CENTRAL DEL CAMPUS UNIVERSITARIO DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL CALLAO EN SETIEMBRE DEL 2012.



FOTOGRAFÍA N°6.4

PLANTACIONES DE UVA EN LA LOCALIDAD DE CAÑETE Y LA SETA
MUESTREADA EN MAYO DEL 2012.

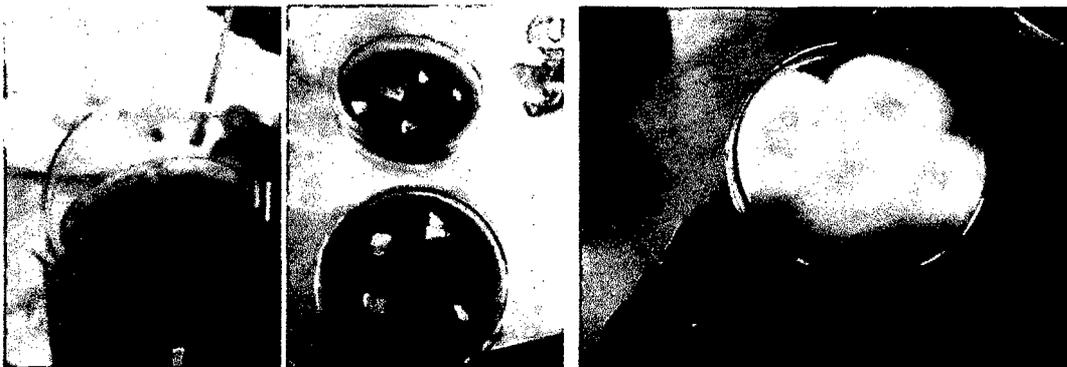


FOTOGRAFÍA N° 6.5
DESINFECCIÓN DE LA SETA PREVIO A LA SIEMBRA SOBRE EL AGAR
SABOURAUD GLUCOSADO MODIFICADO



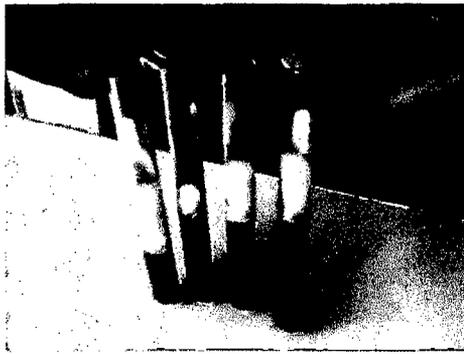
Laboratorio de la Universidad Nacional del Callao de la sede-Cañete

FOTOGRAFÍA N° 6.6
SIEMBRA Y OBTENCIÓN DEL MICELIO A PARTIR DEL PÍLEO DE LA SETA
MUESTREADA. EL MICELIO OBTENIDO ES DESPUÉS DE UN CULTIVO DE
8 DÍAS A 23 °C.



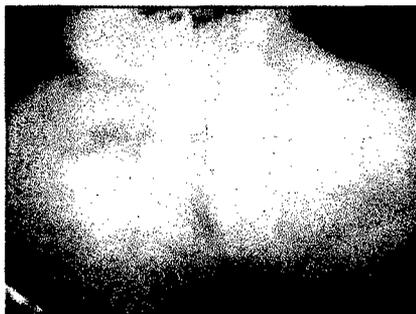
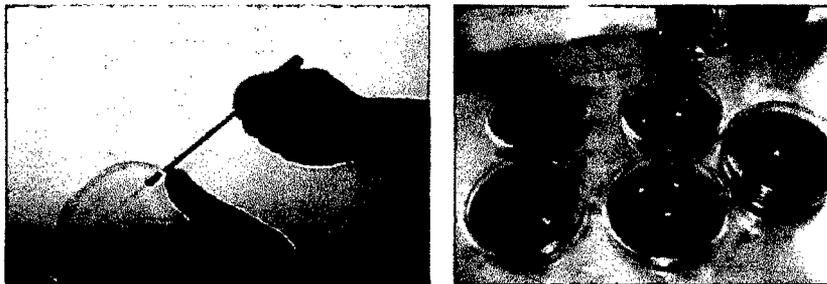
Laboratorio de la Universidad Nacional del Callao de la sede-Cañete (Mayo 2012)

FOTOGRAFÍA N° 6.7
CEPARIOS DESPUÉS DE 72 HORAS DE INCUBACIÓN



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 25/05/2012.

FOTOGRAFÍAS N° 6.8
SIEMBRA EN PUNTURA DEL MICELIO A PARTIR DE CEPARIOS EN
PLACAS CON EL MEDIO DE CULTIVO PARA SU PROLIFERACIÓN. ABAJO:
MICELIO DE LA SETA PROLIFERADO A 25°C POR 8 DÍAS .



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC (Junio/2012).

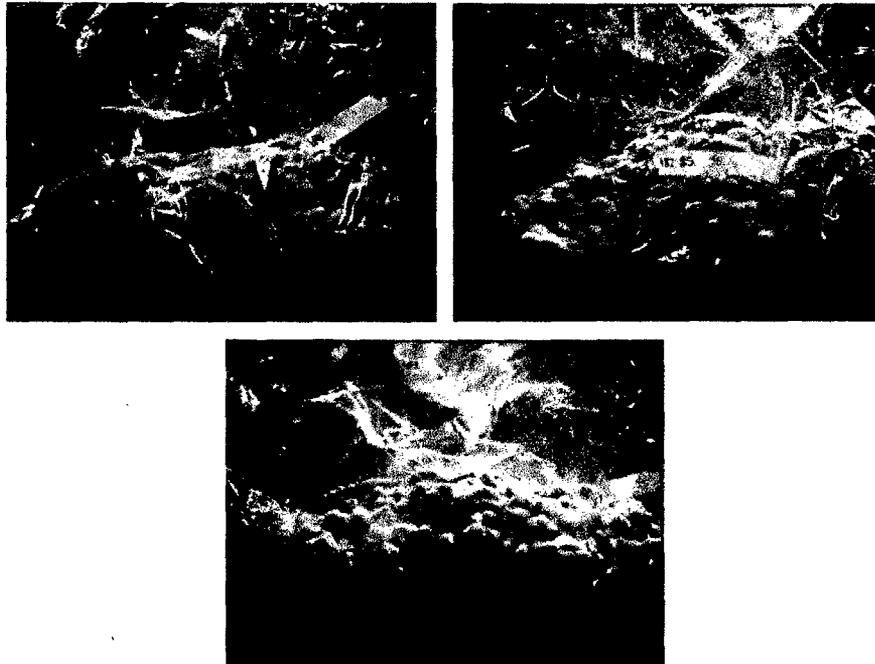
FOTOGRAFÍA N° 6.9

SIEMBRA DE TROZOS DE AGAR INVADIDO DE MICELIO SOBRE LOS GRANOS DE CEBADA; (ARRIBA); BLANCO DESPUÉS DE 15 DÍAS DE INCUBACIÓN A 25° C, EN BOTELLAS Y BOLSAS DE POLIPROPILENO N°2. SE APRECIA MEJOR CRECIMIENTO DEL BLANCO EN LAS BOLSAS (ABAJO).



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC (Junio/2012.)

FOTOGRAFÍA N° 6.10
BLANCO O SEMILLA DE LA SETA SOBRE CEBADA DE TRES SEMANAS DE
CULTIVO.



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC.

FOTOGRAFÍA N° 6.11
BLANCO O SEMILLA DE LA SETA SOBRE TRIGO DE TRES SEMANAS DE
CULTIVO.



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC.

FOTOGRAFÍA N° 6.12
SIEMBRA DEL BLANCO SOBRE LOS SUSTRATOS ELABORADOS EN UN
ÁREA ASÉPTICA CERCA AL MECHERO DE BUNSEN



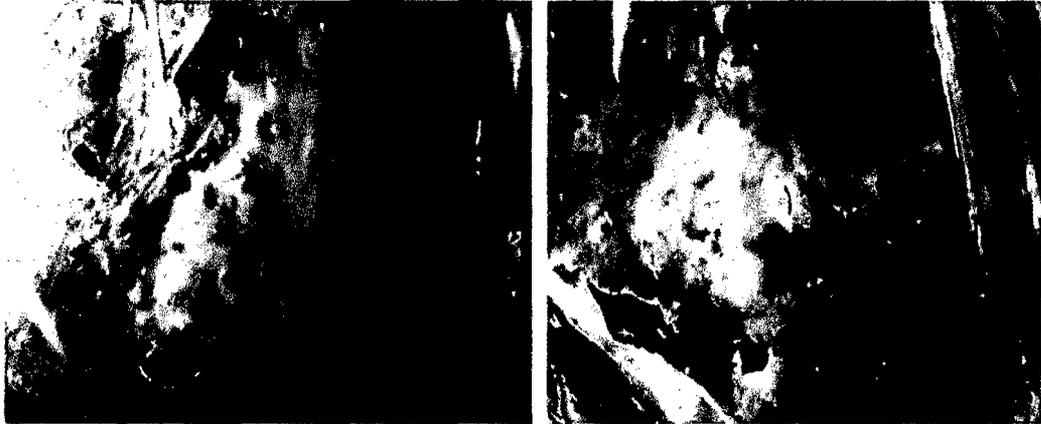
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 17/10/2012.

FOTOGRAFÍA N° 6.13
CRECIMIENTO DEL MICELIO DE LA SETA SOBRE LOS SUSTRATOS
ELABORADOS DESPUÉS DE 10 DÍAS DE CULTIVO (Las 2 bolsas del centro son
sustratos pasteurizados)



Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 27/10/2012.

FOTOGRAFÍAS N° 6.14
CRECIMIENTO DEL MICELIO DE LA SETA DESPUÉS DE 22 DÍAS DE
CULTIVO (Obsérvese las tonalidades amarillentas en el micelio)



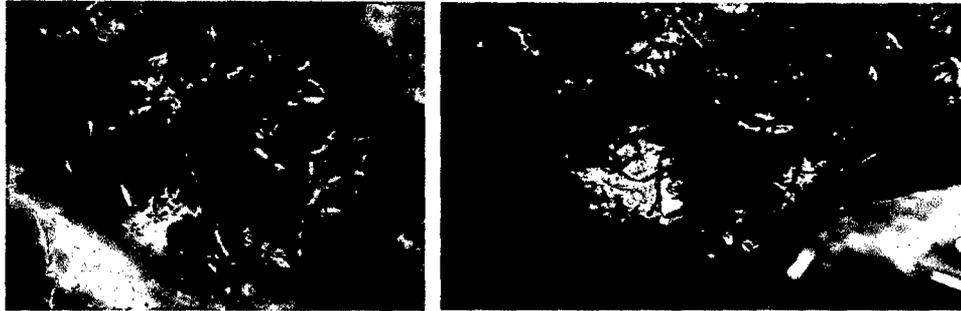
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 08/11/2012

FOTOGRAFÍA N° 6.15
APERTURA DE LAS BOLSAS DE CULTIVO Y ADECUACIÓN DEL
AMBIENTE PARA PROMOVER MAYOR CRECIMIENTO DEL MICELIO
SOBRE LOS SUSTRATOS.



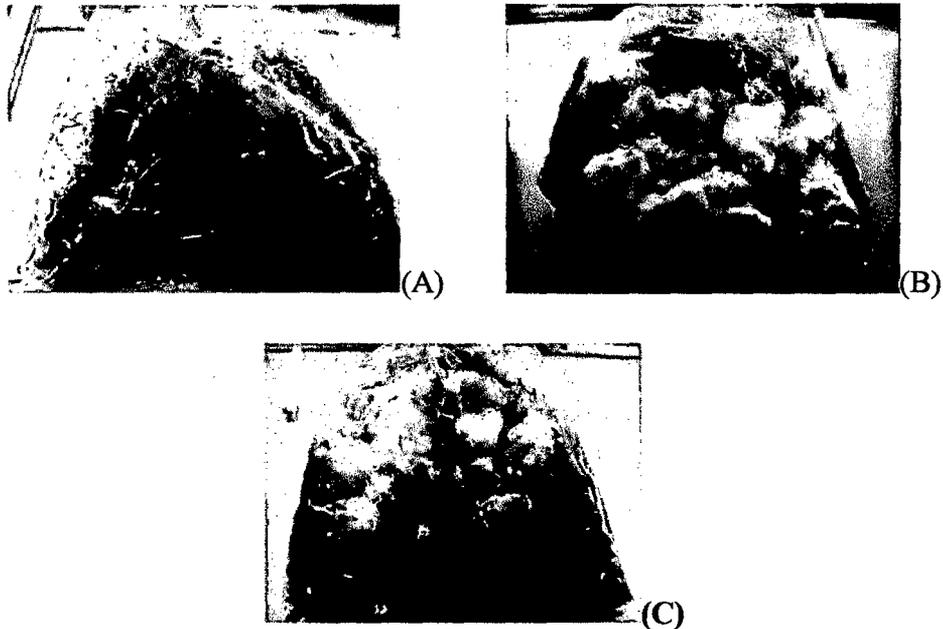
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 12/11/2012.

FOTOGRAFÍA N° 6.16
MICELIOS EN PROCESO DE MUERTE E INVADIDO POR LARVAS DE
MOSCAS



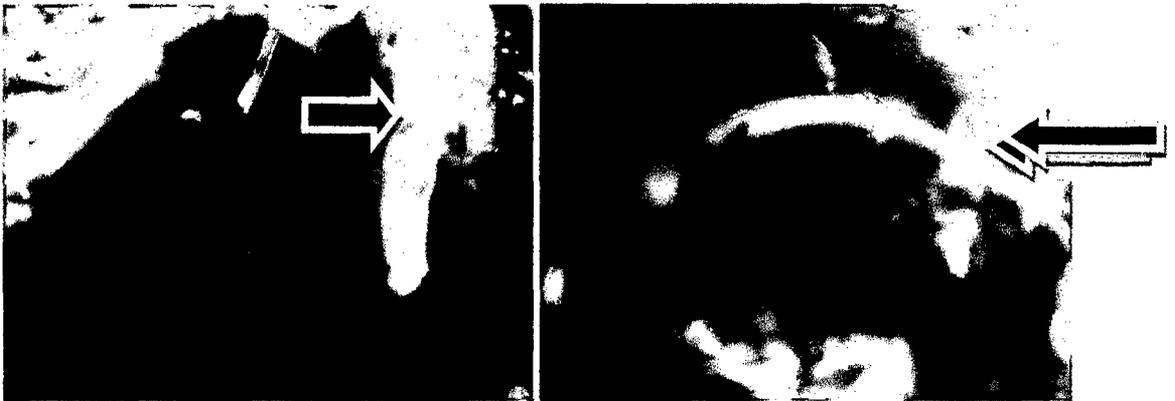
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 17/11/2012.

FOTOGRAFÍA N° 6.17
MICELIO DE LA SETA DE 4 DÍAS DE CULTIVO SOBRE LOS SUSTRATOS: A)
PRE COMPOST DE GRAS; B) PRE COMPOST DE GRAS CON ASERRÍN Y; C)
PRE COMPOST DE GRAS CON ESTIÉRCOL DE CABALLO.



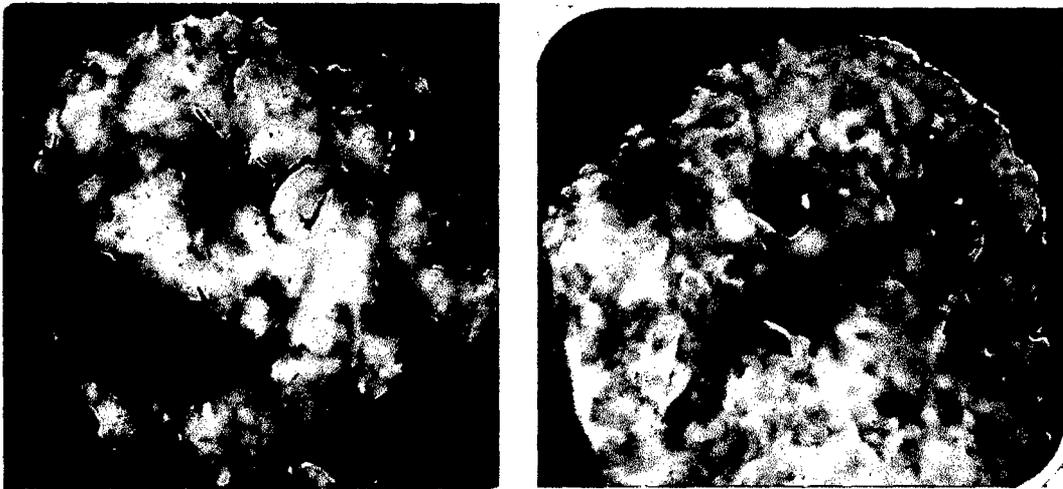
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 08/01/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.18
FRUCTIFICACIÓN DE LA SETA SOBRE EL PRE COMPOST DE GRAS
DESPUÉS DE UN CULTIVO DE 13 DÍAS. LAS FLECHAS SEÑALAN EL
ESTÍPITE (PIE DE LA SETA) CON UN CARPÓFORO PEQUEÑO O
ATROFIADO



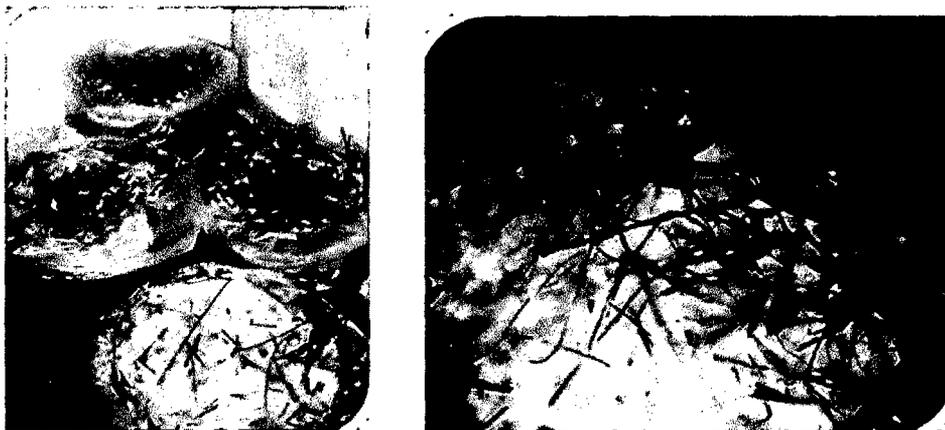
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 17/01/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.19
CRECIMIENTO DEL MICELIO DE LA SETA DE UN CULTIVO DE DOS
SEMANAS SOBRE SUSTRATOS A BASE DE GRAS RESIDUAL CON
ASERRÍN



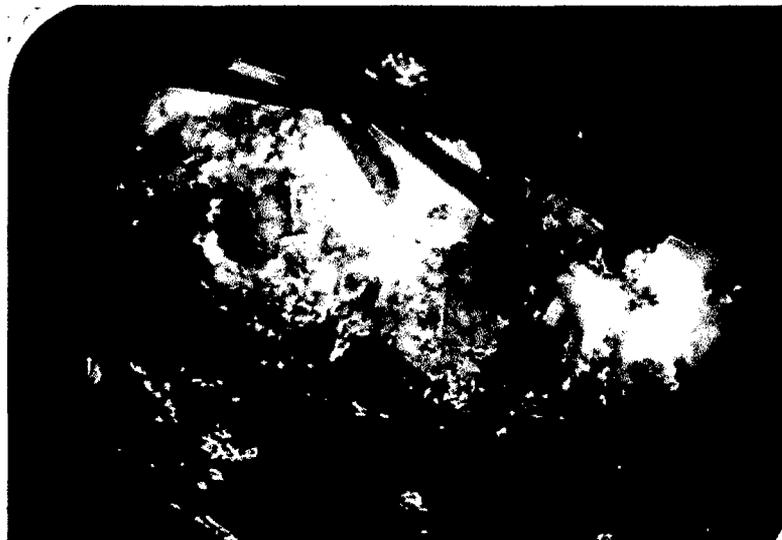
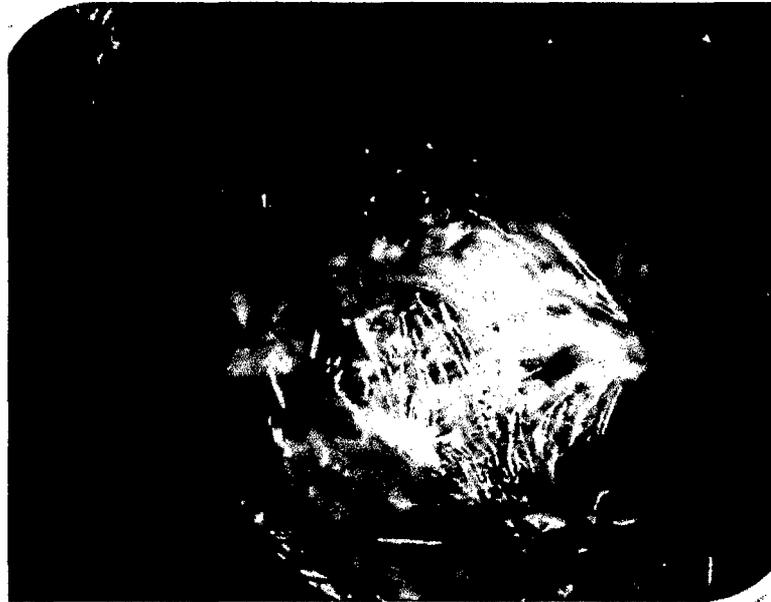
Laboratorio de la sede Cañete FIARN/UNAC 10/05/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.20
INVASIÓN DEL MICELIO SOBRE LA CAPA DE COBERTURA AL DÍA 30 DE
CULTIVO



Laboratorio de sede Cañete FIARN/UNAC 24/05/2013.

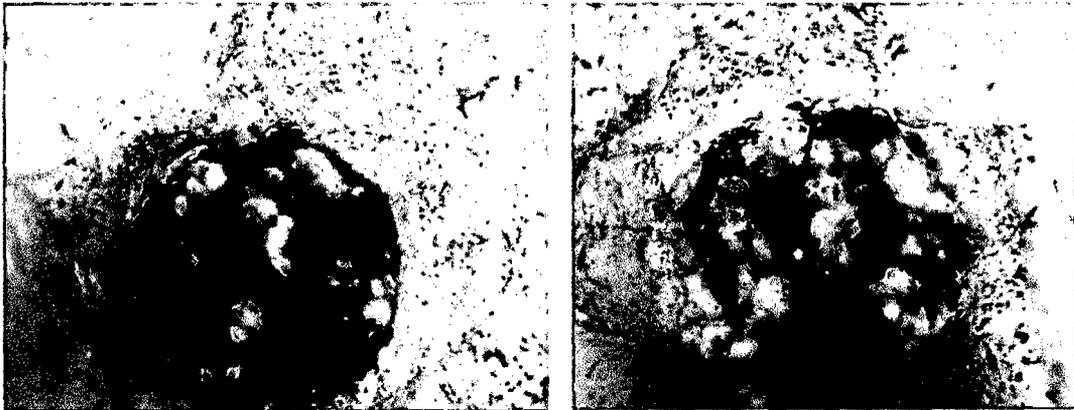
FOTOGRAFÍA N° 6.21
CULTIVO DE 37 DÍAS; SE OBSERVA PIGMENTACIÓN AMARILLENTA E
INVASIÓN DE INSECTOS (MOSQUITOS)



Laboratorio de sede Cañete FIARN/UNAC 31/05/2013.

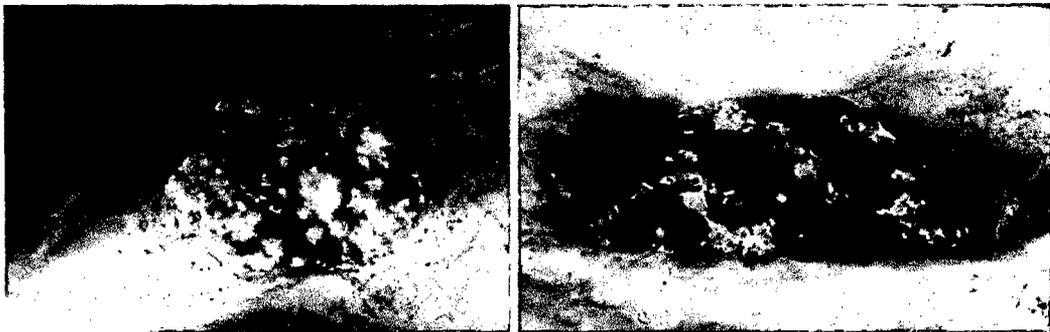
FOTOGRAFÍA N° 6.22

MICELIO DE LA SETA SOBRE EL SUSTRATO DE GRAS CON ESTIÉRCOL DE VACUNO: A) MICELIO DE 7 DÍAS DE CULTIVO; B) MICELIO DE 12 DÍAS DE CULTIVO; C) MICELIO DE 15 DÍAS DE CULTIVO Y; D) MICELIO DE 20 DÍAS DE CULTIVO.



(A)

(B)



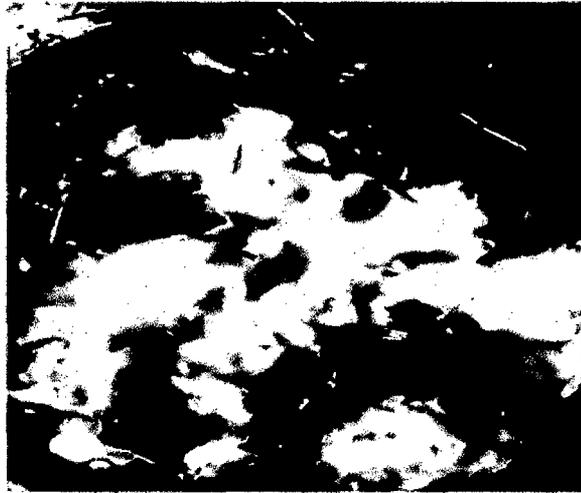
(C)

(D)

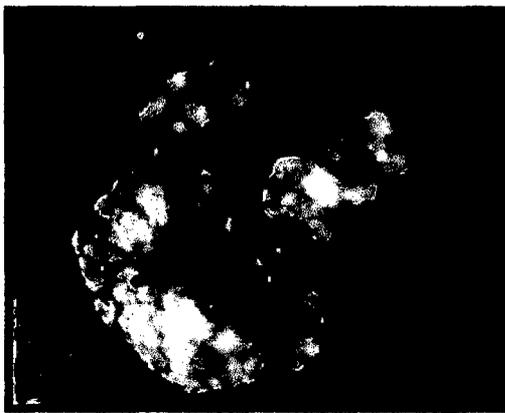
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 26/06/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.23

MICELIO DE LA SETA SOBRE EL SUSTRATO DE GRAS CON ESTIÉRCOL DE CABALLO A) MICELIO DE 7 DÍAS DE CULTIVO; B) MICELIO DE 15 DÍAS DE CULTIVO Y; C) MICELIO DE 20 DÍAS DE CULTIVO.



(A)



(B)



(C)

Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 26/06/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.24

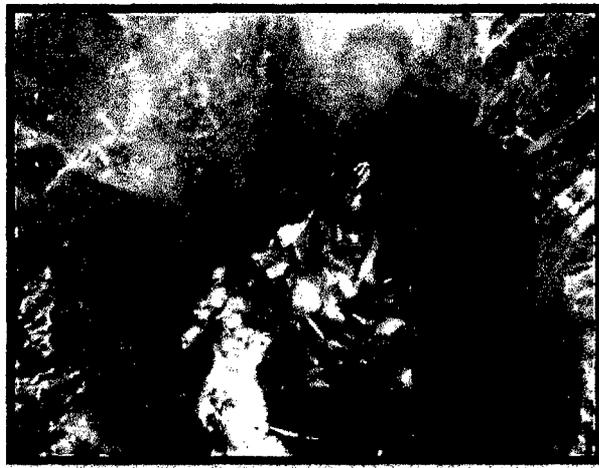
MICELIO DE LA SETA SOBRE EL SUSTRATO DE GRAS CON ASERRÍN DE LA MADERA BOLAINA; A) MICELIO DE 7 DÍAS DE CULTIVO; B) MICELIO DE 15 DÍAS DE CULTIVO Y; C) MICELIO DE 20 DÍAS DE CULTIVO.



(A)



(B)

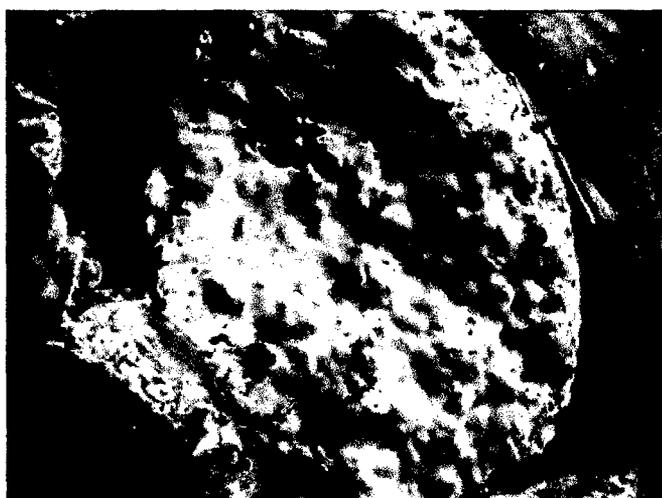


(C)

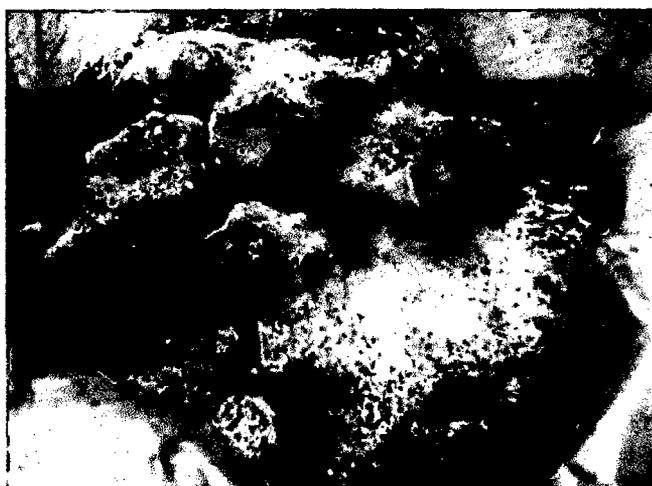
Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 26/06/2013.

FOTOGRAFÍA N° 6.25

MICELIO DE LA SETA DE UN CULTIVO DE 20 DÍAS. A) CRECIMIENTO DEL MICELIO SOBRE SUSTRATO DE RESIDUO DEL MAÍZ MORADO; B) CRECIMIENTO DEL MICELIO SOBRE SUSTRATO DE COMPOST COMERCIAL.



(A)



(B)

Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 26/06/2013.

TABLA N° 6.1

PORCENTAJE DE C, N, y SÓLIDOS TOTALES DEL ASERRÍN Y DEL GRAS

MATERIA	%C	%N	% EN PESO DE SÓLIDOS TOTALES(X)
Aserrín (A)	56.65	0.94	82.26
Gras (B)	44.75	1.82	30.62

Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC

TABLA N° 6.2

PORCENTAJE DE C, N, y SÓLIDOS TOTALES DEL RESIDUO DE MAIZ MORADO

Muestra	Humedad	Sólidos Totales	%Carbono	%Nitrógeno
Residuo del Maíz morado	67.5	32.5	53.66	1.35

Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC 17/10/2012.

TABLA N° 6.3

TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE EL CULTIVO DE LA SETA

DIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15
T(°C)	22	22	22	23	22	23	22	22	23	23	23	21	21	22

Laboratorio de Microbiología FIARN/UNAC.

GRÁFICO N° 6.1

EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PRE COMPOST DE GRAS CON ASERRÍN DE BOLAINA

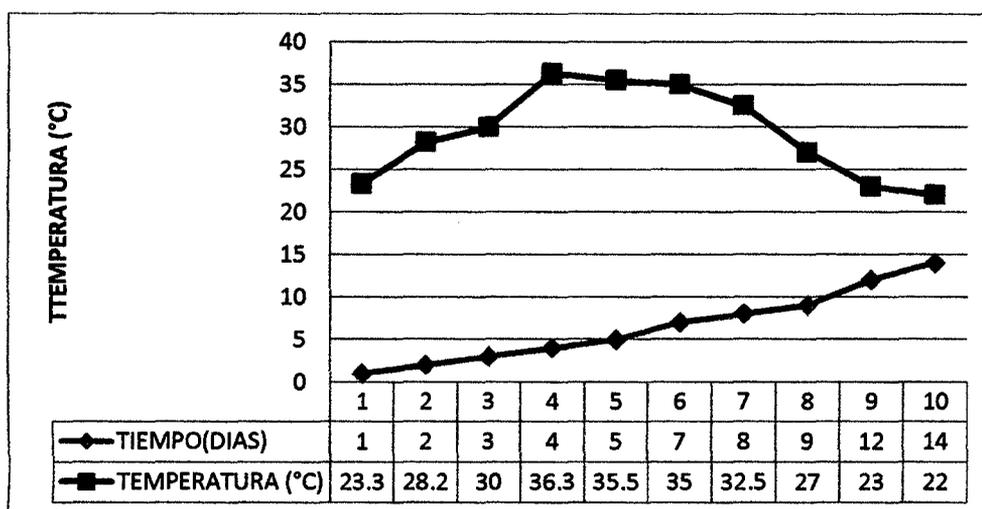


GRÁFICO N° 6.2

EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PRE COMPOST DE GRAS

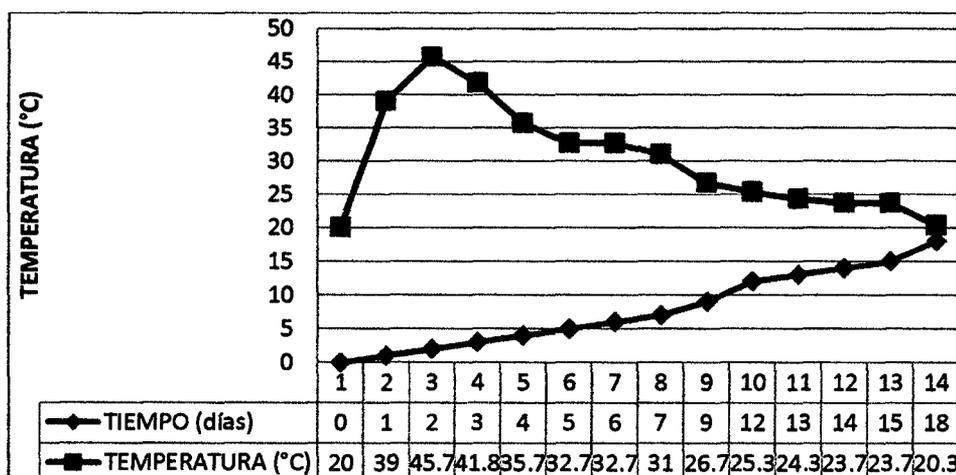
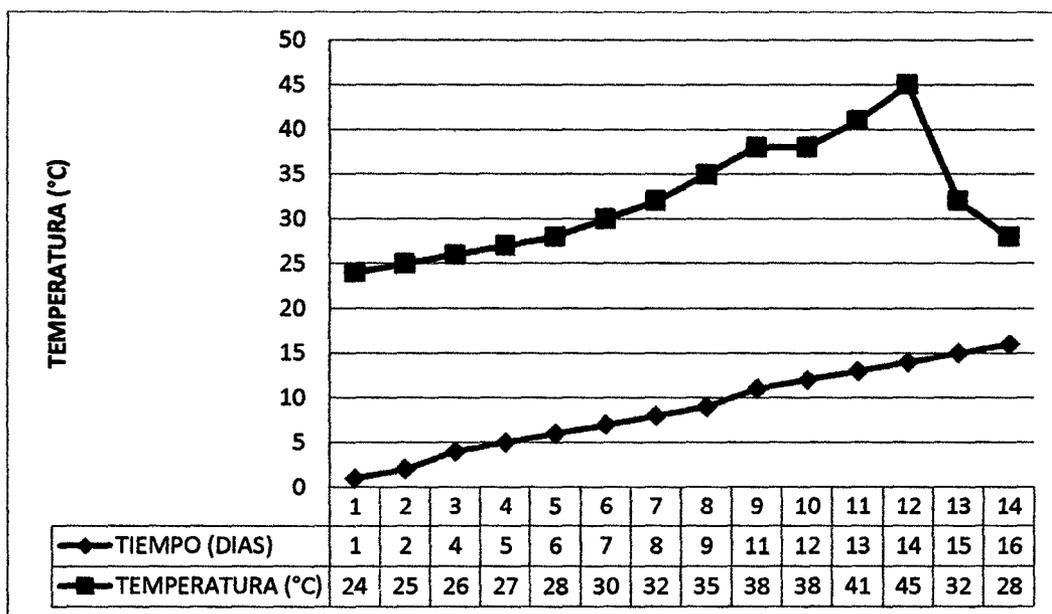


GRAFICO N° 6.3

EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PRE COMPOST DE GRAS CON ESTIÉRCOL DE VACUNO.

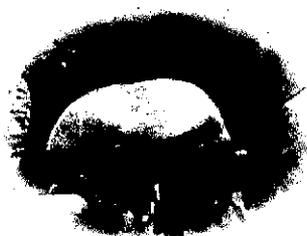


X.- ANEXOS

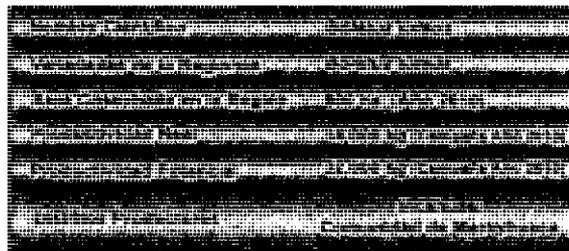
FIGURA. N° 4.1

INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL HONGO DE MARAYHUACA.

HONGO MARAYHUACA



INFORMACIÓN GENERAL DEL PRODUCTO



INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL PRODUCTO

Valor Nutricional del Hongo Comestible de Marayhuaca

Proteínas Total (peso Seco)	20.32 %
Grasas (peso Seco)	3.6 %
Carbohidratos (peso en Seco)	56.58 %
Ceniza (peso en seco)	6.10 %

Fuente: Comunidad Campesina San Isidro Labrador de Marayhuaca, Incahuasi,
Región Lambayeque-Perú. 2013 (6).

FIGURA N° 4.2
PANETONES DE MARAYHUACA



Fuente: Diario El comercio del 10 de Diciembre del 2010(10).

FIGURA N° 4.3
Agaricus campestris RECOLECTADO EN HUASIHUASI-JUNÍN-PERÚ



1.- *Agaricus campestris*
(Huasahuasi - Junin)

Fuente: Pavlich Herrera, Magdalena. "Los hongos comestibles del Perú". 2001 (22).

FIGURA N° 4.4

Agaricus campestris



Fuente: enciclopedia libre de WIKIPEDIA 2012 (10)

FIGURA N° 4.5

Agaricus campestris



Fuente: Ardón López, Carlos Esduardo. La producción de los Hongos Comestibles".
2007. (2)

TABLA N° 6.1

DESECHOS UTILIZADOS EN LA FERMENTACIÓN ANAERÓBICA

CARACTERÍSTICAS	%HUM	% Sólidos T	%C	%N	C/N
VACUNO	79	21	32	1.5	21
OVINOS	73	27	60	3.7	16
EQUINOS	75	25	47	2.4	20
PORCINOS	69	31	73	2.6	28
GALLINÁCEAS	44	56	70.2	-	12
AUQUÉNIDOS	57	43	42	3.7	11
CUYES	32	68	37.2	2.22	17
CONEJO	20	80	47.2	2.02	23
CHALA DE MAÍZ	15	85	39	0.7	56
PAJA DE ARROZ	8	92	41.2	0.7	56
PAJA DE CEBADA	9	93	42	0.88	48
PAJA DE TRIGO	8	92	46	0.53	87
TOTORALES	35	65	41	0.23	178
HOJAS DE PLATANOS	89	11	42	1.10	38
PASTOS	67	33	40	2.52	16
ASERRÍN	-	-	-	0.1	200-500

Fuente: ENERGÍA, DESARROLLO Y VIDA; UNI; BIOAGRICULTURA CASA BLANCA. Resumen del Curso taller: Biodigestores y su aplicación al desarrollo. Abril del 2 002 (11).

TABLA 6.2
 REPORTE DE TEMPERATURA SEGÚN THE WEATER CHANNEL DE LIMA-
 CALLAO ENERO Y FEBRERO DEL 2013

Día	Máx. promedio	Mín. promedio	Media
1	26°C	21°C	24°C
2	26°C	20°C	24°C
3	26°C	20°C	24°C
4	26°C	20°C	23°C
5	26°C	20°C	23°C
6	26°C	20°C	23°C
7	26°C	20°C	23°C
8	26°C	20°C	23°C
9	26°C	20°C	23°C
10	26°C	20°C	23°C
11	26°C	20°C	23°C
12	26°C	20°C	23°C
13	26°C	20°C	23°C
14	26°C	20°C	23°C
15	26°C	20°C	23°C

16	26°C	20°C	23°C
17	26°C	20°C	23°C
18	26°C	20°C	23°C
19	26°C	20°C	23°C
20	26°C	20°C	23°C
21	26°C	20°C	23°C
22	26°C	20°C	23°C
23	26°C	20°C	23°C
24	26°C	20°C	23°C
25	26°C	20°C	23°C
26	26°C	20°C	23°C
27	26°C	20°C	23°C
28	26°C	20°C	23°C
29	26°C	20°C	23°C
30	26°C	20°C	23°C
31	26°C	20°C	23°C

Día	Máx. promedio	Mín. promedio	Media
1	26°C	20°C	23°C
2	26°C	20°C	24°C
3	26°C	20°C	24°C
4	26°C	21°C	24°C
5	27°C	21°C	24°C
6	27°C	21°C	24°C
7	27°C	21°C	24°C
8	27°C	21°C	24°C
9	27°C	21°C	24°C
10	27°C	21°C	24°C
11	27°C	21°C	24°C
12	27°C	21°C	24°C
13	27°C	21°C	24°C
14	27°C	21°C	24°C
15	27°C	21°C	24°C

16	27°C	21°C	24°C
17	27°C	21°C	24°C
18	27°C	21°C	24°C
19	27°C	21°C	24°C
20	27°C	21°C	24°C
21	27°C	21°C	24°C
22	27°C	21°C	24°C
23	27°C	21°C	24°C
24	27°C	21°C	24°C
25	27°C	21°C	24°C
26	27°C	21°C	24°C
27	27°C	21°C	24°C
28	27°C	21°C	24°C

THE WEATER CHANNEL. En el enlace:

<http://espanol.weather.com/climate/annualClimo-Lima->

PEXX0011:1:PE?month=2. Revisado el 1 de Marzo del 2013.

INFORME 01

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA DE HONGO

1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE HONGOS

Los cultivos puros obtenidos se multiplicaron y preservaron en Agar Papa Dextrosa sin aditivos. Para la identificación molecular se procedió a realizar la extracción de ADN del micelio empleando para ello protocolo que combina el uso de nitrógeno líquido seguido de la extracción de ADN con el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Para ello, se colocó en un tubo eppendorf de 2,0 mL una porción de micelio y 500 μ L de buffer tampón de lisis. Esta mezcla fue congelada en nitrógeno líquido durante 2 minutos. Luego de este tiempo, se retira el micelio y es triturado dentro del mismo tubo. Se repitió este procedimiento 3 veces. La suspensión fue centrifugada a 13 000 rpm durante 5 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se continuó la extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito para el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). De manera breve, se colocó en un tubo nuevo 500 μ L de sobrenadante y se agregó 400 μ L de buffer AP1 y 4 μ L de solución de RNasa. Esta mezcla fue incubada a 65°C durante 10 minutos. Durante la incubación se mezcló por inversión unas 2-3 veces. Luego se agregó 130 μ L de buffer P3, se mezcló y se incubó en hielo durante 5 minutos. Esta nueva mezcla fue centrifugada a 13 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue colocado en las columnas de sílica gel del kit y centrifugado a 13 000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a la fase de lavado del ADN, para ello se utilizaron los buffer AW1 y AW2 de manera consecutiva. Finalmente, la columna de sílica gel conteniendo el ADN extraído y lavado fue transferida a un nuevo tubo de 2,0 mL y se agregó 50 μ L de buffer AE. La mezcla fue centrifugada a 13 000 rpm durante 5 minutos y el eluido final conteniendo el ADN se conservó a 4 °C durante toda la noche. Finalmente el ADN obtenido fue conservado a -20 °C hasta su uso.

La verificación de la calidad y cantidad de ADN fue realizada en geles de agarosa al 0.8%, tal como se observa en la figura 1. La concentración de ADN fue estimada comparando la intensidad de luminiscencia entre las muestras y el marcador Lambda DNA cortado con la enzima de restricción *Hind* III.

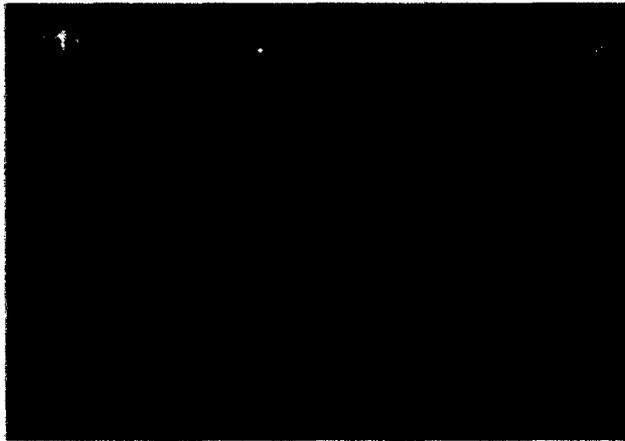


Figura 1. Electroforesis de ADN obtenido de micelios del hongo *Agaricus* spp. Del 1 al 8, muestras de ADN obtenido de micelio (repeticiones). El pocillo 9 indica el marcador de peso molecular utilizado.

2. IDENTIFICACIÓN DEL HONGO MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES:

Para identificación del hongo, se procedió a la amplificación y secuenciamiento del gen 5.8S ribosómico empleando para ello la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers (cebadores) descritos por Russell *et al.* (2011). Las condiciones de amplificación de ADN fueron estandarizadas en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (UNMSM), las cuales consistieron en un volumen total de reacción de 15 μ L con aproximadamente 60 ng de ADN, 7.5 μ L de buffer de PCR 2X (*Taq* polimerasa,

dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs), 1.5 μ L de cada cebador (primer) a una concentración de trabajo de 10 μ M.

Las condiciones de amplificación para la PCR fueron: un ciclo inicial de 95 °C durante 5 minutos; 40 ciclos a 94 °C durante 2 minutos (desnaturalización), 55° C durante 1 minuto (alineamiento) y 72° C durante 2 minutos (extensión); un ciclo final a 72 °C durante 10 minutos (extensión final). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler).

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 1 % (figura 2). Posteriormente se purificaron y se enviaron a una compañía privada para su secuenciación

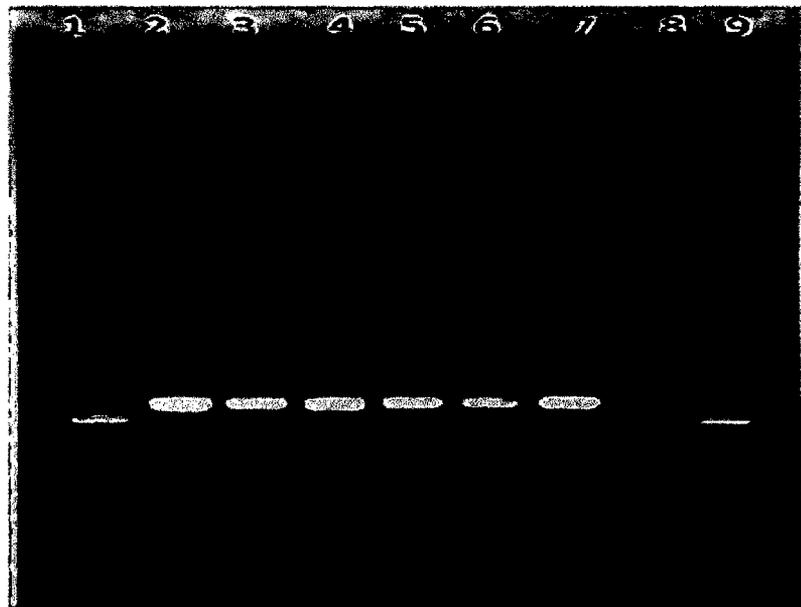


Figura 2. Productos amplificados del gen 5,8S ribosómico del hongo sospechoso del genero *Agaricus*. Del 2 al 7 muestras repetidas, 8 control negativo de PCR, 9 marcador de peso molecular.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa clustal X, y se realizó una búsqueda rápida mediante Blastn en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente, las secuencias fueron utilizadas para realizar un análisis filogenético de las muestras encontradas y las cepas obtenidas, mediante el método de Neighbour Joining (NJ), utilizando el programa Geneious Pro 5.4.6 (Drummond, 2011). Como se observa en la figura 3, la especie evaluada (resaltado en amarillo y señalada como “unknown”) muestra alta identidad con la especie *Agaricus campestris* de la base de datos del GenBank.

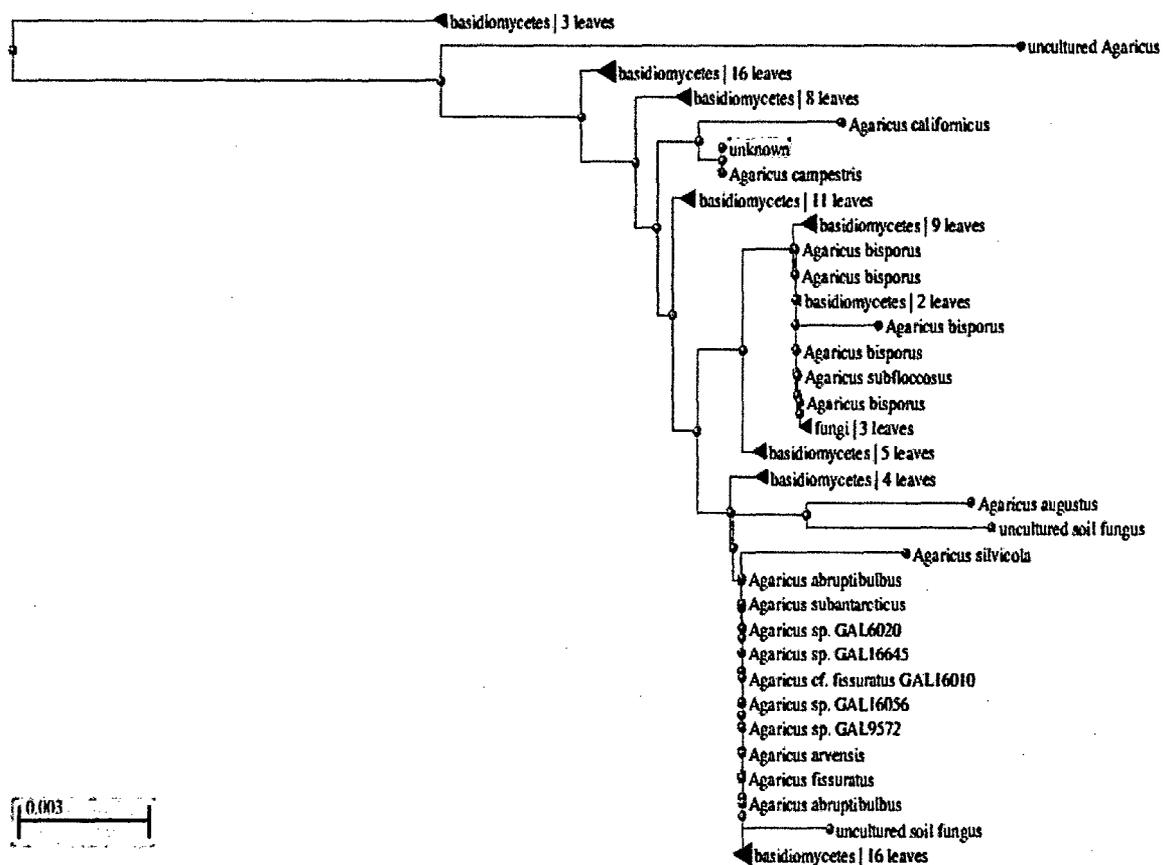


Figura 3. Análisis filogenético de la secuencia 5,8S obtenida de un basidiomiceto aislado en el presente estudio (en amarillo, “unknown”), que corresponde a la especie *Agaricus campestris* con un 99.9% de identidad para la secuencia analizada.

Russell J, Huang J, Anand P, Kaury K, Sandoval A, Dantzler K, Hickman D, Jee J, Kimovec F, Koppstein D, Marks D, Mittermiller P, Nuñez S, Santiago M, Townes M, Vishnevetsky M, Williams NE, Nuñez MP, Boulanger LA, Bascom-slack C y Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethano by endophytic fungi. *Applied and environmental microbiology*, **77**(17): 6076–6084.

Meintjes P, Duran C, Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Thierer T, Ashton B, Heled J. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28** (12): 1647–1649.