



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro interdisciplinario de investigación para el
desarrollo integral regional
CIIDIR-IPN UNIDAD OAXACA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS NATURALES
ESPECIALIDAD PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL

Uso de *Scytalidium thermophilum* para el cultivo semi-comercial de *Agaricus spp.*

MAGDALENA MARIA COELLO CASTILLO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener
el grado de
Maestro en Ciencias

Santa Cruz Xoxocotlán, Oax.; Agosto de 2006



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, Oaxaca siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de Junio de 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA), para examinar la tesis de grado titulada:

“Uso de *Scytalidium thermophilum* para el cultivo de *Agaricus spp*”

Presentada por el alumno (a):

Coello	Castillo	Magdalena María
Apellido paterno	materno	nombre(s)

Con registro:

B	0	4	0	8	3	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dra. Yolanda Donaji Ortiz Hernandez

Dr. José Antonio Sánchez García

M en C. Sonia Trujillo Argüeta

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. María del Rosa Huidobro Viñas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez., Oaxaca, el 07 de julio de 2006, la que suscribe **MAGDALENA MARÍA COELLO CASTILLO**, alumna del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B040834**, adscrita al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autora del trabajo de Tesis: "**Uso de *Scytalidium thermophilum* para el cultivo de *Agaricus spp***", realizado bajo la dirección del Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez, por lo cual cede los derechos de dicho trabajo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **Calle Hornos No. 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca** o e-mail ciidirox@ipn.mx o mcoellocastillo@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



MAGDALENA MARÍA COELLO CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca por permitirme desarrollar mis estudios de posgrado.

Al Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, por concederme la oportunidad de la realización del trabajo de investigación en el Laboratorio de Hongos Tropicales.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de los estudios.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores por su aportación para mi formación profesional.

Al grupo Santander-Serfin, por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de investigación.

Al Dr. José E. Sánchez Vázquez, por permitirme participar dentro de su equipo de trabajo, cuya experiencia y disposición permitieron la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Daniel J. Royse, por sus sugerencias y comentarios durante la realización del trabajo de investigación,

A la Dra. Yolanda Ortiz Hernández, por sus consejos y comentarios durante el curso de los estudios de posgrado y por el apoyo incondicional para que continuara con el trabajo de hongos comestibles

Al Dr. José Antonio Sánchez García, por su respaldo para la realización de mi trabajo de tesis en esta línea de investigación, por sus comentarios y sugerencias para la estructuración del documento.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega, por sus comentarios y sugerencias en la revisión de la tesis.

A la M.C. Sonia Trujillo Argueta, por sus comentarios y sugerencias en la revisión de la tesis.

A la Q.F.B. Lilia Moreno Ruiz, por su valiosa ayuda en la obtención y mantenimiento del material biológico así como sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la investigación.

Al M.C. Rene H. Andrade Gallegos; por el apoyo y orientación en la identificación del material biológico.

Al C. Gerardo Hernández Rojas; por su apoyo en la preparación de los materiales y durante el ciclo de producción de hongos.

M.C. Javier Valle. Por el apoyo especial en el análisis estadístico e interpretación de datos.

A mis compañeros tesisistas del Laboratorio del Hongos Tropicales por su valiosa ayuda, apoyo incondicional y amistad.

De manera especial al Ing. Félix Piñeyro Márquez, por su invaluable apoyo y la confianza depositada en mi

A todas y cada una de las personas que colaboraron para la obtención de esta tesis.....*gracias*

DEDICATORIA

A Dios... por permitirme vivir en este tiempo y espacio.... Y concederme tener una familia... *MUCHAS GRACIAS*

A mi padre †...

... Porque siempre esta presente en todo lo que emprendo y estoy completamente segura que esta satisfecho con este logro. Seguiremos adelante juntos...

A mi madre...

Por la gran lección de vida que me dio.... Por sus ganas de vivir...también seguiremos adelante juntas.

A ti Sergio...

Es el resultado de nuestro esfuerzo y sacrificio. Me resta solamente decirte: Gracias por todo lo que me has dado y que sin ti.... ya no podría existir.

Te amo

Para mi Malenita y mi Fer.... Perdón por todos los sinsabores, reprimendas y ausencia, es con el anhelo de que se superen.....

“El mundo es como es y no puedo cambiárselos
Pero siempre las seguiré
Para darles una mano
Yo las esperaba
Imaginando a ciegas el color de su mirada
Y el timbre de su voz
Hoy que las tengo
Pido al cielo que me deje verlas
Llegar lejos”

..... *Va por ustedes*

A mis hermanos

Lulú... y Alfonso muchas gracias por el apoyo brindado de manera incondicional, *Nicolás... y Vero*, por la invaluable atención a mi familia en mi ausencia, los consejos, las palabras de aliento y todos los buenos deseos que me otorgaron. Continuemos como hasta ahora....

Para la familia Martínez Dolores....

Mis suegros por su ejemplo de vida y trabajo. A Rafa[†] porque luchó por vivir y su ejemplo continúa con nosotros. A Concha, Jose y Mauro por el apoyo incondicional mostrado para mi familia... Gracias.

A todos mis sobrinos (as) con el único interés que sea una motivación para que continúen adelante...

A tres personitas que llegaron para alegrar nuestras vidas Hannia, Dany y Belem.

De manera muy especial a la *Familia Mendoza Barrios*, por su invaluable ayuda y apoyo moral, sin ustedes no habría sido posible este logro, que Dios los bendiga y les retribuya mucho más de lo que ustedes son capaces de otorgar...

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	<u>iii</u>
INDICE DE FIGURAS	<u>iv</u>
INDICE DE TABLAS	<u>v</u>
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
1.1. Objetivos	5
1.2. Objetivos generales	
1.3. Objetivos específicos	
1.4. Hipótesis	
2. FUNDAMENTOS TEORICOS	
2.1. Importancia del cultivo de <i>Agaricus</i> spp.	6
2.1.1. <i>Agaricus bisporus</i>	
2.1.2. <i>Agaricus bitorquis</i>	
2.1.3. <i>Agaricus subrufescens</i>	
2.2. Proceso de producción de <i>Agaricus</i> spp.	
2.2.1. La semilla	8
2.2.2. Método tradicional	10
2.2.2.1. Fases de Composteo	
2.2.2.2. Suplementación	
2.2.2.3. Tierra de cobertura	
2.2.2.4. Limitaciones del método tradicional	
2.3. Métodos alternativos de cultivo	17
2.3.1. Sin composteo	
2.3.2. Con composteo reducido	
2.3.2.1. Importancia de los hongos termofílicos	
2.3.2.2. <i>Scytalidium</i> spp.	
2.3.2.3. Uso de <i>Scytalidium thermophilum</i> como alternativa de producción	

3. METODOLOGÍA	
3.1. Cepas y medios de cultivo	23
3.2. Preparación de inóculo.	
3.3. Materiales	
3.4. Preparación del sustrato	
3.5. Preparación de suplementos	
3.6. Método de cultivo	
3.7. Tratamientos	
3.8. Parámetros a medir	
4. RESULTADOS	
4.1. Influencia de <i>S. thermophilum</i> sobre la velocidad de crecimiento micelial de cepas del género <i>Agaricus</i> spp. a nivel de laboratorio.	31
4.2. Viabilidad técnica de un método de cultivo de <i>A. bisporus</i> sobre un sustrato no composteado colonizado por <i>S. thermophilum</i>	34
4.3. Ensayo de suplementación.	40
4.4. Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de <i>A. bisporus</i>	41
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
7. REFERENCIAS	49
8. APENDICE	
8.1. Influencia de <i>S. thermophilum</i> sobre la velocidad de crecimiento micelial de cepas del género <i>Agaricus</i> spp. a nivel de laboratorio.	55
8.2. Viabilidad técnica de un método de cultivo de <i>A. bisporus</i> sobre un sustrato no composteado colonizado por <i>S. thermophilum</i>	59
8.3. Ensayo de suplementación.	66
8.4. Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de <i>A. bisporus</i>	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desarrollo del trabajo experimental.	23
Figura 2	Aspecto de las tres cepas de <i>S. thermophilum</i> estudiadas. Medio de Cultivo: E. de levadura (0.4%)-Almidón (15%)-MgSO ₄ (0.05%)-2K PO ₄ (0.1%)-Agar (1.5%); pH (7.5), incubación a 45°C, ECS-0601y ECS0602 a 3 días de crecimiento, ECS-0603 a 4 días de crecimiento.	32
Figura 3	Influencia de tres cepas de <i>S. thermophilum</i> sobre el crecimiento micelial de tres cepas de <i>Agaricus</i> spp. Sustrato: pasto pangola <i>D. decumbens</i> con 2% de Cal, temperatura 23°C durante 21 días.	34
Figura 4	Evolución del pH y la temperatura del sustrato, pasto pangola <i>D. decumbens</i> con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, durante un composteo de dos días con la cepa <i>S. thermophilum</i> ECS-0601	35
Figura 5	Humedad en el sustrato, pasto pangola <i>D. decumbens</i> , durante el composteo por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601	36
Figura 6	Evolución de la colonización del sustrato, pasto pangola <i>D. decumbens</i> con 2% de cal, por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601 durante los cinco días del proceso de composteo en un cajón de madera	36
Figura 7	Tasa de extensión lineal (TEL) de <i>A. bisporus</i> ECS 0305 sobre 60 Kg. de pasto pangola <i>D. decumbens</i> composteado por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601	37
Figura 8	Tasa de extensión lineal (TEL) de <i>A. bisporus</i> ECS 0305 sobre 40 Kg. de pasto pangola <i>D. decumbens</i> composteado por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601	38
Figura 9	Determinación de la eficiencia biológica de <i>A. bisporus</i> ECS-0305 sobre pasto pangola <i>D. decumbens</i> composteado con <i>S. thermophilum</i> ECS-0601. Cantidad inicial de sustrato 60 Kg.	39
Figura 10	Determinación de la Eficiencia biológica de <i>A. bisporus</i> ECS 0305 sobre 40 Kg. de pasto pangola <i>D. decumbens</i> composteado por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601.	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica del genero <i>Agaricus</i> .	6
Tabla 2	Composición química del pasto pangola <i>D. decumbens</i> .	18
Tabla 3	Clasificación taxonómica del <i>S. thermophilum</i> .	21
Tabla 4	Distribución de tratamientos para la determinación de la Tasa de Extensión Lineal de las tres especies de <i>Agaricus</i> spp. en pasto pangola precolonizados por tres cepas de <i>S. thermophilum</i> .	27
Tabla 5	Distribución de tratamientos para la evaluación de cuatro suplementos proteicos.	28
Tabla 6	Distribución de las mezclas de tres suplementos proteicos para la evaluación de la EB de <i>A. bisporus</i> ECS0305 en un sustrato precolonizado por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601.	28
Tabla 7	Tasa de Extensión Lineal de tres cepas de <i>S. thermophilum</i> en dos medios sintéticos y pasto pangola <i>D. decumbens</i> adicionado con 2% de cal (45°C).	32
Tabla 8	EB de <i>A. bisporus</i> ECS 0305 del ensayo de suplementación con cuatro suplementos proteicos en pasto pangola <i>D. decumbens</i> adicionado con el 2% de cal y 10% de carbonato de calcio y precolonizado por <i>S. thermophilum</i> ECS0601.	41
Tabla 9	Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de <i>A. bisporus</i> ECS 0305 sobre pasto pangola <i>D. decumbens</i> composteado por <i>S. thermophilum</i> ECS 0601.	42

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizó el crecimiento micelial de tres cepas de *Scytalidium thermophilum* (ECS-0601, ECS-0602 y ECS-0603), y la influencia de éstas en el crecimiento de *Agaricus bisporus* ECS-0305, *A. subrufescens* ECS-0302 y *A. bitorquis* ECS-0316. Así mismo, se evaluó la viabilidad técnica de un método alternativo de cultivo de *A. bisporus* a escala semicomercial, que no emplea la fase I de composteo y, finalmente, se probaron tres suplementos proteicos para evaluar su influencia en la eficiencia biológica de *A. bisporus* cultivado por este mismo método. Las diferencias morfológicas y de crecimiento micelial entre las cepas de *S. thermophilum*, fueron básicamente en cuanto a la forma, el color de las esporas y la precocidad en la esporulación. La velocidad de crecimiento varió según la cepa y el medio de cultivo utilizado, entre 1.51 cm/d (ECS-0603 sobre LPDA), y 3.76 cm/d (ECS-602 sobre pasto pangola). Las tres cepas del género *Agaricus* presentaron valores entre 1.4 – 0.9 mm/d sobre el sustrato sin colonización previa de *S. thermophilum*. En los tres casos el efecto positivo en el crecimiento fue debido a la presencia de *S. thermophilum* (incrementos de tasa de extensión lineal entre 122 y 145%). Al implementar las compostas para pasteurizar el sustrato, se observó que la cantidad de sustrato utilizado influyó directamente en el éxito de la composta. Con 40 kg de sustrato y pilas de 40cm de altura, la temperatura no excedió de 46°C, los valores de pH variaron de 8.4 a 8.1 y la humedad fue de 67 a 61%, muy adecuadas para la colonización de *S. thermophilum*. *A. bisporus* presentó tasas de crecimiento estadísticamente diferentes, cuando se sembró sobre el sustrato composteado en los días D2 y D3 con tasa de extensión lineal 0.329 y 0.323 mm/d respectivamente, a diferencia de los tratamientos D0 y D5 (0.185 y 0.125 mm/d.). Los valores de eficiencia biológica obtenidos variaron entre 35 y 79%. Finalmente en la evaluación de tres suplementos proteicos la eficiencia biológica varió entre 50 y 74%. El análisis estadístico (para un $\alpha= 0.05$) señaló que no hubo diferencia entre tratamientos.

Palabras clave: Hongos termofilicos, *Agaricus* spp., composteo reducido,

ABSTRACT

In this work, the lineal extension rate of three strains *Scytalidium thermophilum* (ECS-0601, ECS-0602 y ECS-0603), and their influence on the growth of *Agaricus bisporus* ECS-0305, *A. subrufescens* ECS-0302 y *A. bitorquis* ECS-0316 was determined. Also, the technical viability of an alternative method of production *A. bisporus* on a semi-commercial scale, without phase I of composting, was evaluated and finally, three protein supplements and their influence on biological efficient de *A. bisporus* were tested. Differences on morphology and mycelial growth among the strains of *S. thermophilum* were observed, basically on shape, color of the spores and sporulation. The growth speed varied according to strain and culture media, between 1.51 cm/d (ECS-0603 on PDYA), and 3.76 cm./d (ECS-602 pangola grass). The three strains of *Agaricus* spp. showed values between 1.4 – 0.9 mm/d on the control (substrate non colonized by *S. thermophilum*). In all cases a positive effect on growth due to the *S. thermophilum* was observed (increase of LER between 122 and 145%). In regarding the preparation of compost to pasteurize the substrate, it was observed that amount of substrate used influenced directly the compost success. Using 40 kg substrate and piles of 40 cm of height, temperature did not increase beyond 46°C, pH values varied between 8.4 -8.1 and moisture between 67-61%. These parameters were suitable for colonization of *S. thermophilum*. *A. bisporus* grew statistical fastest when it was inoculated on a substrate composted for two or three days (LER of 0.329, 0.323 mm/d respectively) than on D0 and D5 (0.185 and 0.125 mm/d.) BE varied between 35 and 79%. Finally, in the evaluation of three protein supplement, BE varied between 50 and 74%. Statistical analysis showed no difference between treatment ($\alpha=0.05$).

Keys words: Thermophilic fungi, *Agaricus* spp. Reducing compost, Portobello

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de hongos comestibles se ha incrementado más de 14 veces en 30 años, desde 350 mil ton en 1965 hasta cerca de 4,909,000 ton en 1994 (Sánchez y Royse, 2001b). Las principales especies cultivadas son: el champiñón *Agaricus bisporus*, la seta *Pleurotus ostreatus*, el shiitake *Lentinula edodes*, el hongo rosado *Volvariella volvacea*, entre otros.

La importancia económica que tiene la producción comercial de *Agaricus* spp. se debe a que representa más del 31.8% de la producción total de hongos a nivel mundial (Chang, 1999). Lahman y Rinker (2004), señalan que en América Latina el volumen de producción anual es de 59, 674 ton, y para México estiman una producción anual de 37,230 ton. Esta producción es obtenida con el método tradicional de composteo, en dos fases, que utiliza una mezcla de paja de trigo con estiércol de ganado vacuno y en ocasiones suplementado con fertilizantes minerales.

Cabe nombrar a otras especies del genero *Agaricus*, como alternativa para introducir especies resistentes a plagas y enfermedades *A. bitorquis* o para satisfacer la demanda de productos con propiedades nutraceuticas, como *A. subrufescens* (anteriormente conocida como *A. blazei*), que también son cultivadas con el mismo método tradicional.

Debido a nuevas exigencias técnicas, económicas y ambientales, actualmente se considera al método tradicional como un sistema con ciertas insuficiencias y deficiencias; principalmente las derivadas del composteo, en la fase I, a la intemperie. El proceso es tardado, requiere mucho espacio, mano de obra y es costoso; además depende de manera directa de los factores ambientales, se observa una pérdida de materia seca y la emisión libre de metabolitos, que representan un gran problema para los productores por la alta sensibilidad de la población a la contaminación ambiental (Pardo, 1997; Duns *et al.*, 2004).

Por tal motivo se han propuesto nuevas alternativas de producción de *Agaricus* spp. tales como el uso de aereación forzada de la composta en la fase I en contenedores o túneles (Op den Camp *et al.*, 1991) el uso de sustratos no composteados y materiales minerales, con la obtención de eficiencias biológicas entre el 90 y 166% (Sánchez y Royse, 2001a; Sánchez

et al., 2002 y Bechara *et al.*, 2005); sin embargo el inconveniente de estos métodos es que implican un alto costo de producción por los ingredientes que se requieren o el uso de altas temperaturas para pasteurizar o esterilizar los sustratos, lo cual complica su aplicación en plantas productoras de hongos.

Por otra parte, el uso de hongos termofílicos, como *Scytalidium thermophilum*, en la estimulación de la velocidad de crecimiento micelial y la producción de *Agaricus* spp. a partir de aislamientos de inóculos de compostas y en sustratos no composteados (Straastma *et al.*, 1989; Straastama *et al.*, 1991; Sánchez, 2006). Aunque no está totalmente definido el efecto de *S. thermophilum*, los estudios se han enfocado a reducir el tiempo de composteo en sustratos “crudos” así como en ejercer un mayor control en las temperaturas y homogenización de los sustratos, además de disminuir la producción de metabolitos volátiles al ambiente.

La utilización de materiales y técnicas simplificadas que se adapten a los intereses y circunstancias de productores rurales, accedería a ofrecer nuevas alternativas de desarrollo. En este estudio se implementó, una técnica de producción sencilla, basado en resultados previos que han demostrado que el uso de *S. thermophilum* permite obtener cuerpos fructíferos de *Agaricus* spp. sobre pasto pangola no composteado (Sánchez *et al.* 2006). La implementación de la técnica a una escala mayor, ya no de laboratorio, sino semi comercial, y el incrementar la eficiencia biológica, con la adición de suplementos, permitirá definir un método alternativo no solo viable, sino competitivo.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Implementar un método alternativo para el cultivo de *Agaricus* spp. que suprima la fase I de composteo a cielo abierto.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de tres cepas de *Scytalidium thermophilum* ECS-0601, ECS-0602, ECS-0603 en el crecimiento de *A. subrufescens* ECS-0302, *Agaricus bisporus* ECS-0305 y *A. bitorquis* ECS-0316.
- Evaluar la adición de tres suplementos en la estimulación de la fructificación de *A. bisporus*.
- Implementar una técnica de producción de *Agaricus* spp. utilizando un sustrato no composteado.

1.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- La influencia de *Scytalidium thermophilum* sobre el crecimiento de *Agaricus* spp. depende de las cepas utilizadas.
- La eficiencia biológica en *Agaricus* spp. depende del tipo de suplemento adicionado al sustrato.
- El uso de *Scytalidium thermophilum* permitirá el cultivo de *Agaricus* spp. suprimiendo la fase I de composteo.

2. FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1. *Agaricus* spp.

Numerosas especies de hongos basidiomicetes tienen una larga historia como alimentos o con propósitos medicinales. Cerca de 650 de las 14 000 especies conocidas poseen propiedades farmacológicas importantes y casi 100 han sido probadas para su cultivo. De éstas, cerca de 40 son cultivadas comercialmente y siete son cultivadas a escala industrial (Wasser *et al.*, 2002). La tabla 1 muestra la clasificación taxonómica del género *Agaricus* de acuerdo a Hawksworth *et al.*, 1995; Ulloa *et al.*, 2002.

Reino: <i>Fungi</i>	Filo: <i>Basidiomycotina</i>	Clase: <i>Basidiomycetes</i>
Orden: <i>Agaricales</i>	Familia: <i>Agaricaceae</i>	Género: <i>Agaricus</i>
Especie: <i>bisporus</i> (Lange) Imbach ECS-0305 <i>bitorquis</i> (Qué.) Sacc ECS-0316 <i>subrufescens</i> Peck. ECS-0302		

Tabla 1 Clasificación taxonómica del genero *Agaricus*

La producción mundial de hongos comestibles se estima en más de 2.7 millones de toneladas, siendo tres especies las de mayor importancia: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* spp. (hongo ostra) y *Lentinula edodes* (hongo shiitake), los cuales son producidos en muchas regiones del mundo. En América Latina se produce menos del 1% del total de la producción (Lahman, 2004).

El champiñón *A. bisporus* es un organismo heterotrófico que depende de una mezcla de materiales orgánicos para satisfacer sus requerimientos nutricionales. El material básico para la composta del hongo es el estiércol de caballo, pero además hay mezclas con sustratos sintéticos, como trigo y otras pajas de cereales adicionados con estiércol de caballo o fertilizantes minerales (Randle, 1983).

A continuación se describen las características de tres especies de *Agaricus* que tienen importancia económica; *A. bisporus* que es la especie más conocida y demandada por el consumidor a nivel mundial, *A. bitorquis* es una especie resistente a enfermedades y representa una alternativa de producción para los productores. En la actualidad ha surgido un tendencia a nivel global hacia el consumo de productos que ayudan a mantener la salud o en la cura de enfermedades, por lo que el mercado otorga un valor agregado a determinadas especies que poseen propiedades nutraceuticas, como es el caso de *A. subrufescens*.

2.1.1. *Agaricus bisporus*

Agaricus bisporus presenta sombrero de 5 - 6 cm de diámetro, con fondo blanquecino y fibrillas radiales; pie corto, cilíndrico, blanco crema, fistuloso, un poco bulboso; anillo medio supero ascendente, no muy amplio, membranoso; láminas libres que varían de un rosa pálido a pardo-oscuros con margen pálido. Las esporas son, de ovales a elípticas o apiculadas.

Harvey 1982, señala que *A. bisporus* está clasificado entre los basidiomicetos de pudrición blanca. Estos hongos utilizan la lignina y la celulosa de los tejidos de la madera o materiales ricos en ambos compuestos.

2.1.2. *Agaricus bitorquis*

Agaricus bitorquis (Qué.) Sacc. tiene un estípote de 5 a 15 cm de diámetro, es de convexo inicialmente a plano con la edad, algunas veces con el margen doblado hacia arriba, superficie lisa, blanquecina, comúnmente con polvo adherido, carne gruesa y de olor firme.

Las laminillas son libres, pálidas y café blanquecino en la madurez. El estípote es de 4 a 10 cm de largo y de 2 a 4 cm de diámetro, blanco, convexo inicialmente a plano con la edad; algunas veces con el margen doblado hacia arriba, con superficie lisa, blanquecina, comúnmente con polvo adherido, carne gruesa y de olor firme.

Entre las principales características de esta especie destacan: las posibilidades de crecer a temperaturas y concentraciones de CO₂ más elevadas que las recomendadas para *A.*

bisporus y la resistencia a enfermedades causadas por el virus “die-back”. Difiere además en el número de esporas formadas en el basidio (Gea, 1995).

2.1.3. *Agaricus subrufescens* Peck

Agaricus subrufescens Peck fue cultivado primero a fines de 1800 en el oriente de Norteamérica; más recientemente, algunos especímenes silvestres fueron encontrados en Brasil. Su cultivo ha sido introducido en Brasil, en Japón y en otras partes. Este hongo ha sido referido por varios nombres, más comúnmente como *Agaricus blazei* Murill (*sensu* Heinemann) y más recientemente como *A. brasiliensis* Wasser *et al.* (Kerrigan, 2005). Es conocido como “hongo almendra” u “hongo con sabor a almendra”, debido a su fragancia y sabor. La producción comercial de este hongo declinó en Estados Unidos por los cambios en las preferencias en el mercado debido al surgimiento de *A. bisporus* (J.E.Lange) Imbach.

Agaricus subrufescens es una de las especies más prometedoras e intensivamente estudiadas. Está caracterizada por un amplio rango de propiedades medicinales, antitumorales principalmente. Las sustancias activas de esta especie están compuestas de polisacáridos, obtenidos mayormente de los cuerpos fructíferos. Así durante la década de los 80 y 90, se demostró que posee actividades antimutagénicas, bactericidas y estimula al sistema inmunológico, promoviendo el mecanismo de defensa natural del cuerpo contra una gran variedad de agentes infecciosos como el cáncer (Wasser *et al.*, 2002). Actualmente es cultivada comercialmente en Japón y en Brasil y se prevé un incremento y dispersión de su cultivo debido a estas propiedades.

2.2. Proceso de producción de *Agaricus* spp.

El proceso de producción de *Agaricus* spp. es común para las tres especies descritas anteriormente.

2.2.1. La semilla

La cepa es la base para el cultivo del hongo. Se entiende por cepa “al micelio de un hongo desarrollado en una caja petri o en un tubo de ensaye, es decir, un conjunto de hifas de un solo individuo (Guzmán *et al.*, 1993). El termino semilla o blanco de hongo, se refiere al micelio del hongo utilizado para inocular un sustrato dado. Es el material empleado para

sembrar cuando se cultivan hongos, también se le denomina inóculo (Sánchez *et. al.* 2001). La semilla se obtiene mediante un método de propagación asexual. Hay dos tipos de semilla: la semilla madre, master o primaria y la secundaria o semilla para siembra.

La semilla primaria también conocida como inóculo primario, proviene directamente del micelio del hongo cultivado sobre un medio a base de agar, esto significa que para su preparación el sustrato empleado se inocula con un trozo de agar. El sustrato para producir la semilla secundaria, por el contrario, es inoculado con un primario de crecimiento activo. Muy comúnmente, el sustrato utilizado para preparar los primarios son granos mientras que para los secundarios se utilizan desechos agrícolas. La semilla secundaria se usa como inóculo del sustrato que producirá finalmente fructificaciones cosechables. (Quimio, 2001).

En la mayoría de los laboratorios se utiliza granos de cereales impregnados con soluciones nutritivas, éstas últimas son muy importantes porque se obtienen incrementos en las cosechas de hongos hasta de un 60% (Royse *et al.*, 1982). Lo importante de la selección del material para la siembra del hongo, es la habilidad del organismo para crecer en él y además la disponibilidad, los costos y la facilidad de preparación. Cabe mencionar que el grano con que se elabora el inóculo, también aporta nutrimentos que ayudan a que el micelio se nutra una vez que se realizó la inoculación del sustrato. El grano debe de contener una calidad óptima de proteínas y carbohidratos que permitan un vigoroso desarrollo del micelio (Soto, 2004).

Para la producción de inóculo se utilizan diversas semillas que se lavan e hidratan. El grano que se emplea para elaborar el inóculo también resulta importante, ya que si bien es cierto que se recomienda el empleo de varias gramíneas, como el arroz, la cebada, el maíz, el centeno, etc., por lo general se utiliza el trigo, el sorgo o el mijo, los cuales por su disponibilidad y precio en las diversas regiones de México, han tenido una amplia aceptación entre los productores de inóculo (Soto, 2004).

Cabe resaltar que la totalidad de la semilla comercial se elabora con micelio proveniente de un cultivo almacenado, más que de esporas, porque cada espora es capaz de producir una nueva cepa y sus características son impredecibles.

2.2.2. Método de cultivo tradicional

El método tradicional de cultivo de *Agaricus* spp. involucra la elaboración de una composta (fase I) y la estabilización de ésta (Fase II). La composta produce el complejo ligno-celulósico de tipo húmico en el que se encuentran todos los elementos necesarios para la nutrición y el metabolismo de *Agaricus* spp. Este material compuesto principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa y se prepara de la siguiente forma:

2.2.2.1. Fases de composteo

La primera fase (I), también llamada de fermentaciones libres, implica el desdoblamiento aeróbico de los materiales “crudos” y la segunda fase (II) de fermentaciones dirigidas y controladas, de pasteurización y “acondicionamiento” (un composteo en el que se controla la temperatura, la aeración y a veces la concentración de algunos gases y la humedad) para obtener al final un medio de crecimiento selectivo (Sinden y Heuser, 1953; Wuest, 1977; Overtjins, 1998).

La fase I es un proceso que comienza con la conversión inicial del sustrato, pero lo más importante, es la sucesión y acción de los diferentes microorganismos que preparan el terreno para las reacciones químicas que se producen a elevadas temperaturas. Estas reacciones permiten que el nitrógeno forme parte integral del complejo humus-lignina. El mecanismo o los mecanismos para que el nitrógeno se ligue con la molécula de lignina no son completamente conocidos, pero la reacción es favorecida por las altas temperaturas y pH elevado, con ello se libera amonio en forma de urea, se desdoblan las proteínas y consigo se libera calor, por las múltiples reacciones que generan temperaturas mayores de 60°C. El resultado es un complejo húmico-lignina rico en nitrógeno, el cual es verdaderamente resistente al ataque de microorganismos.

La alta calidad de la composta es el resultado de un proceso aerobio que incluye primero un gran número de organismos mesofílicos, hongos termotolerantes y bacterias que incrementan durante el estado inicial del composteaje. Por efecto de la adición de agua, la población de hongos comienza un crecimiento rápido y con ello una liberación de energía en forma de calor. Los hongos observados en este estado del composteo incluyen especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sordaria*, *Alternaria*, *Mucor* e invariablemente

Doratomyces. Algunas bacterias metabolizan nutrientes disponibles y contribuyen al incremento de la temperatura en la composta (Harvey, 1982).

Como la temperatura sube, los mesofílicos y las bacterias mueren y son reemplazados por poblaciones de microorganismos termofílicos (45°C). Las bacterias como *Proteus microoccus* y *Aerobacter* utilizan nitrógeno orgánico e inorgánico y son acompañadas por consumidores de carbohidratos, bacterias de géneros como *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Serratia* que degradan la grasa, los almidones, la celulosa y la cera de la cutícula de la paja. Estos organismos además degradan partes de la lignina en la paja. En algún momento *Streptomyces thermovulgarius* y *S. rectus* generan calor adicional y los actinomicetes nitrificantes elevan la concentración de amonio a niveles tóxicos para otros miembros de la microflora de la composta (Harvey, 1982)

La obtención de una composta de calidad se realiza durante la fase II, como resultado del control de la sucesión ecológica de microorganismos termofílicos, los cuales selectivamente utilizan los desechos de los compuestos nitrogenados inestables y los carbohidratos disponibles en la composta.

La sucesión microecológica durante la fase II, consiste en la propagación de actinomicetes termofílicos y hongos. Dos actinomicetos, *Thermoactinomyces* y *Thermomonospora*, que se encuentran comúnmente, consumen amonio como fuente de nitrógeno para la síntesis de sus células. Un grupo de hongos no celulolíticos ayudan a los actinomicetes en la conversión de amonio; estos incluyen a *Humicola launginosa*, *H. stellata*, *Mucor* y *Thermoascus*. El porcentaje de conversión de amonio es más rápido y el proceso más eficiente en las primeras 60 horas de la fase II (Harvey 1982).

Cuando la temperatura baja a menos de 53 °C se presentan un gran número de poblaciones fúngicas mesofílicas, donde predominan *Humicola griseus*, *Scytalidium thermophilum*, *Humicola insolens*, *Torula* y *Myriococcum*, los cuales asimilan carbono del sustrato debido a su actividad celulasa (Harvey, 1982; Schisler, 1982). Estos hongos tienen la habilidad de degradar celulosa cristalina (pura) y preceden a un grupo secundario que tienen menor capacidad de degradar el complejo formado por la celulosa. Este incluye a *Malbranchea*, *Stilbella thermophila* y *Talaromyces*. Finalmente el proceso de composteo

concluye con el agotamiento de los nutrientes dentro del sustrato, la composta se enfría a menos de 45°C, los hongos termofilicos mueren y dejan como residuos sus membranas celulares, las cuales están compuestas por polisacáridos. Ácidos grasos como ácido linoleico y proteínas que constituyen una rica reserva para *A. bisporus*, que son desdoblados por acción enzimática del micelio del hongo y absorbidos como fuente de energía y crecimiento.

En estudios de dinámicas poblacionales, específicamente la densidad de *S. thermophilum* se ha encontrado correlacionada de manera positiva con la producción de *Agaricus* y estimula fuertemente la Tasa de Extensión Lineal (TEL) del micelio del hongo. De manera general *S. thermophilum* provee de una composta selectiva, que protege el crecimiento micelial de *Agaricus* contra la acción de efectos negativos de bacterias, además se supone que *S. thermophilum* provee de un disparador para estimular el crecimiento de *A. bisporus* por un mecanismo todavía no definido, en donde algunas sustancias volátiles pueden estar incluidas (Straastma 1989).

El método tradicional se ha adoptado en todo el mundo porque tiene muchas ventajas: selectividad para el crecimiento del champiñón en lugar de posibles competidores, rendimientos económicamente aceptables y calidad de los hongos a bajo costo además de emplearse a gran escala. Sin embargo tiene varios inconvenientes: es tardado, requiere mucho espacio y mano de obra; es costoso y puede resultar nocivo para el medio ambiente.

2.2.3. Suplementación

Se entiende por suplementación, la práctica de adicionar compuestos nutritivos diversos (concentrados proteicos, carbohidratos o lípidos) a la fórmula nutritiva utilizada para cultivar un hongo. Durante el desarrollo y expansión de la industria de la producción de champiñones en los últimos 30 años, la suplementación de la composta ha sido una práctica recurrente. Por definición, los suplementos deben ser aplicados cuando el proceso de composteo ha concluido. En la práctica, pueden ser adicionados en la siembra, el momento de añadir la tierra de cobertura y/o durante la fase de producción (Randle, 1983)

❖ Suplementación durante la producción.

Esta práctica no es muy común porque se tiene que remover y reemplazar la tierra de cobertura para adicionar el suplemento. Randle (1983), menciona que el número de esporóforos se reduce drásticamente cuando la tierra de cobertura es removida. Esta práctica se ha realizado, en donde se reporta que la producción declina en las últimas oleadas de primordios, debido seguramente a la acumulación de metabolitos tóxicos o al agotamiento de los nutrientes. Las dosis utilizadas son del 2.5% del peso seco de la composta cuando comienza la segunda oleada en la producción.

❖ Suplementación durante la siembra

Este método consiste en la adición de los suplementos en el momento de la siembra, pero presenta dos problemas principales: el sobrecalentamiento de la composta y la incidencia de hongos, por lo que se aplican dosis bajas de suplemento, en tasas menores del 2.5 % del peso seco de la composta. Entre los principales materiales utilizados se tiene: leche descremada en polvo, harina de semillas de algodón, harinas de pescado, soya, linaza, frijol, melaza, granos de arroz, avena, centeno, salvado de trigo, entre otros. (Sinden y Schisler, 1962; Schisler y Sinden, 1966).

❖ Suplementación al añadir la tierra de cobertura

Los problemas antes mencionados se resolvieron al adicionar los suplementos al momento de añadir la tierra de cobertura, en compostas bien colonizadas (a los 21 días en promedio de incubación a 23°C). Se aplican suplementos a base de semillas crudas o refinadas con una elevada concentración de proteínas hidrolizadas, específicamente las que contienen fenilalanina, leucina, isoleucina y valina, en proporciones mayores al 10% del peso seco de la composta, con ello se obtienen incrementos sustanciales en la producción de *A. bisporus*, particularmente en la primera oleada de primordios con una baja incidencia de microorganismos competidores (Schisler y Sinden, 1962; Schisler y Sinden, 1966; Randle, 1983).

La utilización de éstos materiales por el micelio del hongo así como por otros microorganismos presentes en el sustrato genera un sobrecalentamiento de la composta, por tal razón surgió la idea de usar nutrientes de liberación lenta. Esta práctica fue patentada por Carrol y Schisler en 1976, quienes utilizaron harina de semilla de algodón mezclada con aceite de cacahuete y los trataron con formaldehído al 10%. Este compuesto tenía la finalidad de desnaturalizar y reducir la solubilidad de las proteínas del suplemento e inhibir la utilización de los nutrientes por los competidores; así el micelio del hongo después de dos semanas de incubación puede utilizar lentamente los lípidos y proteínas disponibles, lo que se refleja en el periodo de producción (Vijay *et al.*, 2002).

La adición de nutrientes usualmente es del 4 al 10 % del peso seco de la composta, con ello se estimula un crecimiento micelial vigoroso. Comúnmente todos los suplementos desarrollados para la adición de la composta a la siembra o en la tierra de cobertura han sido basados en productos altamente proteínicos. Estos incluyen productos de harina de soya, harina de gluten de maíz (60%), harina de plumas de aves de corral hidrolizada (85%) y otros materiales (Dahlberg, 2004)

Los efectos esperados en la producción de los suplementos no solamente son debidos al contenido de N de los suplementos. Los compuestos carbonados como los carbohidratos permiten un buen incremento en la producción de hongos. Muchos carbohidratos complejos no son atacados por los microorganismos de la composta, y por consiguiente no contribuyen al calentamiento de la composta. Los suplementos con carbohidratos son ideales para usar a cielo abierto, en compostas activas y en donde la capacidad de enfriar es limitada. Investigaciones preliminares sugieren que algunos carbohidratos son menos atacados por patógenos del género *Trichoderma*, por tal razón son más resistentes al mildiú verde.

Algunos otros suplementos, como los minerales Mg, Ca, I, Cu, Mn, Zn, y a menudo el Mo pueden ser adicionados a las mezclas. Ellos son requeridos para el crecimiento de los hongos. Las fuentes de calcio más comunes son el carbonato de calcio (CaCO_3), sulfato de calcio (CaSO_4) y el hidróxido de calcio (CaOH). El calcio se encuentra en las regiones apicales de crecimiento de hifas establece gradientes de H^+ , pH, eléctricos e iónicos, juega

un papel importante como segundo mensajero en la transferencia de estímulos físicos, químicos o eléctricos con efectos intracelulares específicos, tiende a inducir diversos efectos en el crecimiento, diferenciación y esporulación en diferentes especies de hongos entre ellos *A. bisporus* (Jennings, 1995; Sánchez y Royse, 2001a; Hernández *et al.*, 2003; Royse y Sánchez, 2003; Sánchez, 2006).

2.2.4. Tierra de Cobertura

La tierra de cobertura es el material que se aplica como recubrimiento superior de la composta, una vez que esta ha sido colonizada por el hongo. A través de ella se desarrollarán los cuerpos fructíferos. La tierra de cobertura cumple varias funciones: constituye un soporte físico, protege la superficie del sustrato colonizado, absorbe gran cantidad de agua, proporciona agua para el crecimiento y desarrollo del micelio, contiene y favorece los factores que inducen la fructificación y proporciona un ambiente aireado al micelio. Una variedad de materiales pueden ser usados para cobertura, como suelo mineral, composta de hongos desechada y convertida para material de cobertura, turba (Pardo, 1997).

A continuación se describe algunos de los materiales más utilizados para elaborar el suelo de cobertura:

Suelo Mineral. El suelo provee de condiciones óptimas para el intercambio de gases entre la composta y el aire, además de una capacidad de retención de agua. Como regla, la cobertura con suelo mineral requiere de 1 a 1.5 pulgadas de profundidad. El uso irracional de este sustrato puede causar efectos erosivos del suelo.

Composta de hongos reutilizada. La composta de hongos agotada puede ser convertida a tierra de cobertura. Para ello debe ser apilada a no más de 60 -65 cm de altura, y debe de estar suficientemente descompuesta, de un color oscuro, consistencia suave, con una buena calidad de absorción de agua

Turba. Es un material orgánico compacto, de color oscuro, rico en carbono que proviene de la putrefacción de vegetales de los pantanos, contiene cerca del 50% de materia

orgánica y es considerado como un producto superior para cobertura, principalmente porque posee una alta capacidad de retención de agua. En general, al usar turba se requiere de mayor profundidad en la cobertura que con suelo mineral. Es de resaltar la importancia del espesor de la capa de tierra de cobertura añadida, ya que influye directamente en la producción de primordios y con ello en el rendimiento total del cultivo de hongos. La profundidad de la capa de turba más recomendable es de 3 cm, menor espesor de la capa ocasiona problemas en la capacidad de retención de agua y disminuye el tamaño de los hongos (Sinden y Schisler 1962, Schisler y Wuest 1982).

Carbón activado: Recientemente en experimentos preliminares se agregó una capa de 2.54 cm de turba, carbonato de calcio y un 25% de carbón activado, funcionando de manera igual o mejor que la mezcla tradicional (Bechara 2005).

2.2.5. Limitaciones del método tradicional

El método tradicional de composteo de dos fases, debido a nuevas exigencias técnicas, económicas y ambientales, va considerándose como un sistema con ciertas insuficiencias y deficiencias. Principalmente las derivadas en la fase I, la falta de homogeneización y transformación de los materiales, demasiada influencia directa de los factores meteorológicos, grandes pérdidas en materia seca, capacidad productiva de los sustratos no siempre previsible en regularidad y gran producción y emisión libre de metabolitos contaminantes del ambiente (Pardo, 1997).

La fase I de composteo se lleva a cabo bajo condiciones incontrolables de emanación de olores, variación de temperaturas y contenido de oxígeno, lo que puede resultar en un proceso de composteo anaerobio y por consiguiente la producción de olores desagradables ocasionados por la reducción de azufre orgánico (sulfitos), aminos y amonio, ácidos grasos volátiles y compuestos que son menos ofensivos como alcoholes; y la presencia de bacterias anaerobias (Op den Camp et al. 1991, Duns et al. 2004).

2.3. Métodos alternativos de cultivo

En 1962 surgió una alternativa: Till comunicó que era posible producir champiñones en una mezcla en donde el material básico era aserrín esterilizado (121 °C durante dos horas) y que no había sido composteado previamente. Posteriormente, Murphy (1972) comunicó de sus esfuerzos por producir este hongo sin un composteaje a cielo abierto (fase 1) y Mee (1978) demostró que también era posible producir el champiñón en un abono sin compostear (“frío”). Finalmente ya existe un procedimiento para preparar un sustrato sin compostear similar a la tecnología empleada para cultivar Shiitake (sustrato pasteurizado a 110 °C durante 15 minutos) pero para la producción de *A. bisporus* (Sánchez y Royse, 2001; Sánchez *et al.*, 2002)

En años recientes, los hongos han sido producidos en sustratos que contienen semillas de algodón, paja de trigo y/o avena, aserrín o combinación de éstos ingredientes. En algunas partes, éstos materiales pueden no estar disponibles o son disponibles a precios muy elevados. Por lo que actualmente se trabaja con sustratos alternativos, principalmente esquilmos agrícolas disponibles, de costo más accesible y que tienen la posibilidad de incrementar la producción y la calidad de los hongos (Royse, 2004).

El pasto pangola *Digitaria decumbens* es un sustrato comúnmente usado como alimento de ganado, se encuentra disponible en grandes cantidades, es económico y apto para el cultivo de los hongos (Hernández *et al.*, 2003; Coutiño *et al.*, 2004, Sánchez *et al.* 2006). Es un material que con 2 ó 3 días de composteo permite el cultivo de hongos, en la Tabla 2 se muestra la composición química del pasto pangola de acuerdo a Sánchez *et al.*, 2006.

Contenido	%
Cenizas	9.2 ±0.09
Grasas	1.3 0.02
Fibra	31.7± 0.9
Proteínas	3.5 ±0.07
Carbohidratos solubles	54.1± 0.5
Fibras Neutrales	77.7± 1.5
Fibras acidas	47.2±0.4
Hemicelulosa	30.4 ±0.4
Celulosa	34.5 ±0.7
Lignina	10.3 ±0.1
Carbono	43.1± 0.8
Hidrógeno	5.6± 0.1
Nitrógeno	0.53 ±0.01

Tabla 2 Composición química del pasto pangola *Digitaria decumbens*

2.3.1. Sin composteo

Actualmente existe la posibilidad de obtener eficiencias biológicas desde un 30.1% hasta el 96% de *Agaricus bisporus* en sustratos no compostados no convencionales previamente pasteurizados durante 20 minutos a 110 °C. Entre los materiales no composteados se encuentran mezclas a base de aserrín de encino, mijo, centeno, harina de soya, turba canadiense - vermicomposta, germen de alfalfa, salvado de trigo, carbonato de calcio, olote de maíz, sorgo, estiércol de borrego, pulpa de café y pasto (Sánchez *et al.*, 2002, García *et al.* 2005)

Se han evaluado además sustratos no composteados ricos en carbohidratos para el cultivo de *A. bisporus*, como granos de arroz comerciales y un suplemento con nutrientes de liberación lenta a diferentes proporciones. Además se señala también, el uso de perlita, material silíceo poroso y granular de origen volcánico, como reservorio para incrementar la humedad disponible (68%) para el desarrollo del hongo. El rendimiento promedio fue 0.64

kg comparado con 0.36 kg para el tratamiento sin perlita y una eficiencia biológica del 166% (Bechara, 2005).

2.3.2. Con composteo reducido

Diversos estudios se han enfocado al uso de microorganismos termofílicos, como *S. thermophilum*, para acortar el ciclo de producción de la composta, con la finalidad de mantener un mejor control en el proceso de composteo y obtener un material más homogéneo; se ha señalado que la fase I no es un pre-requisito para llevar a cabo la fase II en la preparación de la composta y que la precolonización del sustrato por *S. thermophilum* es importante para estimular el crecimiento, desarrollo y producción de *A. bisporus* (Straatsma *et al.*, 1991; Wiegant, 1992). Sin embargo estos métodos no han sido adoptados porque las conclusiones de esos estudios indican que la inoculación con *S. thermophilum* no es necesaria dado que el inóculo ya está presente en el proceso, que el efecto de este hongo sobre *A. bisporus* es incierto, que la eliminación de la fase I a través de la inoculación de *S. thermophilum* no es económicamente viable y que la fase I es necesaria para suavizar la paja y los demás materiales que componen el sustrato (Straastma *et al.* 1995, Gerrits *et al.* 1995).

2.3.2.1. Importancia de hongos termofílicos

La temperatura es una de las variables ambientales que juega un rol determinante en la sobrevivencia, crecimientos, distribución y diversidad de microorganismos en la tierra. La mayoría de los microorganismos vive en un rango de temperatura de 10-45°C y son llamados organismos mesófilos otros se denominan psicrófilos (0-20°C); pocos son capaces de crecer en rangos entre 20-80°C y muy escasos como *Psyrodictium furiosum*, denominados termófilos extremos, que crecen entre 90-105°C. Entre las 100,000 especies de hongos conocidos, los termofílicos son considerados agentes potenciales para la bioconversión y biodegradación de diversos materiales, aunque su número es reducido (Satyanarayana *et al.*, 1992).

En el proceso de cultivo del champiñón, los efectos que se atribuyen a la acción de los hongos termofílicos se refieren a la disminución de la concentración de amonio que neutraliza el medio para el crecimiento micelial de éste; a la inmovilización de nutrientes

para otros microorganismos competidores para una disponibilidad de éstos por el micelio y finalmente un efecto de estimulación-crecimiento en el champiñón (Wiegant, 1992).

Straastma (1994) identificó nueve especies de hongos termófilos que promueven el crecimiento micelial de *A. bisporus*: *Chaetomiun thermophilum*, *Chaetomiun* sp., *Malbrachea sulfurea*, *Myriococcum thermophilum*, *Scytalidium thermophilum*, *Stilbella thermophila*, *Thielavia terrestres* y dos basidiomicetes. Menciona que la densidad de *S. thermophilum* ha sido correlacionada positivamente con la producción de hongos y que estimula fuertemente el crecimiento micelial, ya que *A. bisporus* puede alcanzar una velocidad de crecimiento en promedio de 7 mmd^{-1} .

Algunos especies de hongos termofilicos no promueven el crecimiento de *A. bisporus*, entre éstos, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus fumigatus* y *Zigomycetes*, todos comunes en fases tempranas del composteo. Se aislaron actinomicetes y bacterias (*Bacillus licheniformis*) que tienen efectos adversos en el crecimiento de *Agaricus bisporus*, pero este efecto fue contrarrestado por *S. thermophilum* (Straastma et al., 1991).

2.3.2.2. *Scytalidium thermophilum*

La Tabla 3 muestra la clasificación taxonómica de *S. thermophilum* de acuerdo a Straastma y Samson, 1993, Hawksworth *et al.*, 1995; Ulloa *et al.*, 2002.

Reino: Fungi	División: <i>Deuteromycotina</i>	Clase: <i>Hiphomycetes</i>
Orden: <i>Moniliales</i>	Familia: <i>Demathiaceae</i>	Género: <i>Scytalidium</i>
Especie: <i>thermophilum</i> ECS-0601 <i>thermophilum</i> ECS-0602 <i>thermophilum</i> ECS-0603		

Tabla 3 Clasificación taxonómica del *S. thermophilum*

Straastma y Samson 1993, presentaron la siguiente sinonimia para *S. thermophilum* (Cooney & Emerson) Austick:

= *Humicola grisea* Traaen var. *Thermoidea* Cooney & Emerson

= *Torula thermophila* Cooney & Emerson

= *Humicola insolens* Cooney & Emerson

Straastma y Samson (1993), concluyeron que las colonias de *S. thermophilum* crecen rápidamente y alcanzan un diámetro de 9 cm en cinco días a 40°C. Presenta micelio de color verde oscuro, especialmente en los márgenes e hifas hialinas de 4-6 µm de ancho, con paredes lisas. Los conidios son elipsoidales o globosos, con paredes lisas y gruesas, pigmentadas de color oscuro, con 8 –12 µm de diámetro.

2.3.2.3. Uso de *Scytalidium thermophilum* como alternativa de producción.

Straastma y Samson (1993) mencionan que *S. thermophilum* es una de las especies dominantes en compostas para producción de hongos. Bajo ciertas condiciones pueden convertir diversos sustratos en materiales que pueden ser utilizados por *A. bisporus*. Se ha señalado la importancia del uso de hongos termofílicos, como *S. thermophilum* en la estimulación de la velocidad de crecimiento micelial y producción de *Agaricus* spp., la disminución de la concentración de amonio y la inmovilización de nutrientes (Straastma *et al* 1989, Straastama *et al.* 1991, Wiegant *et al.* 1992, Sánchez 2006).

La inoculación durante la segunda fase del proceso de composteo puede considerarse como una manera de acortar el tiempo de preparación del sustrato para el cultivo de *A. bisporus*; la inoculación puede realizarse de dos maneras: antes o después de la fase de pasteurización; en el caso de la primera las esporas actúan solo como inoculo y en la segunda tanto el micelio como esporas actúan como inoculo (Wiegant, 1992)

Es importante mencionar que la temperatura óptima de crecimiento para *S. thermophilum* es hasta los 55 °C, las hifas mueren a los 58°C y las esporas a los 68°C; es común encontrarlo en las pajas y estiércoles de caballo.

3. METODOLOGIA

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Micología y la Planta Piloto de hongos comestibles de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Tapachula, Chiapas, México. El esquema de trabajo se presenta en la Figura 1. Los experimentos se realizaron en tres etapas. Una desarrollada bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (laboratorio) y las dos restantes en condiciones semicontroladas de temperatura y humedad (planta piloto).

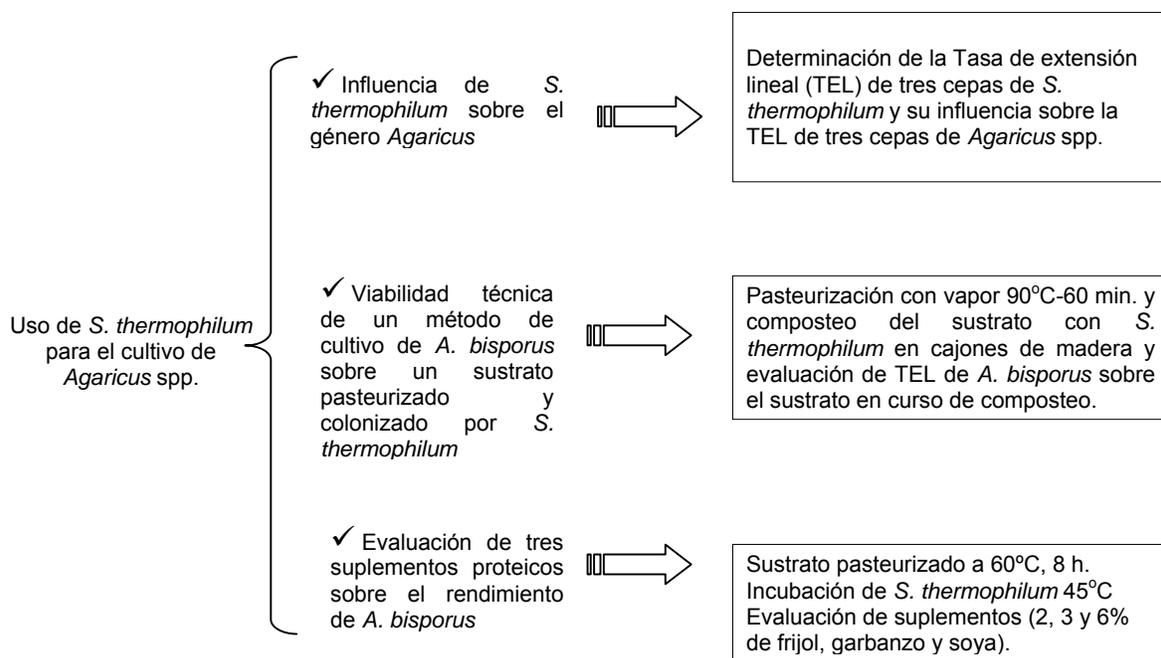


Figura 1 Desarrollo del trabajo experimental.

3.1. Cepas y medios de cultivo

Se utilizaron las cepas de *A. bisporus* var. Portobello ECS-0305; *A. bitorquis* ECS-0316 y *A. subrufescens* ECS-0302. También se usaron las cepas de *Scytalidium thermophilum* ECS-0601, ECS-0602 y ECS-0603, todas propiedad del cepario micológico de Ecosur. El medio utilizado para el mantenimiento de las cepas del género *Agaricus* fue infusión de papa (20%), adicionada con dextrosa (1%) y agar (1.5%) en agua destilada. Para las cepas de *S. thermophilum* se utilizó el medio extracto de levadura (0.3%) con infusión de papa

(20%), dextrosa (1%) y agar (1.5%) en agua destilada. Además de extracto de levadura (0.4%), almidón (15%), fosfato dipotasio (0.1%), sulfato de magnesio (0.05%) y agar (1.5%). Ajustados a pH de 7.5 y esterilizados a 120°C durante 20 minutos.

3.2. Preparación de inóculo

La semilla de *Agaricus* spp. se preparó con granos de sorgo, hidratados al 70%, mezclados con el 2% de CaCO₃ (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, S.A. de C.V.) y el 1% de CaSO₄ (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, S.A. de C.V.), esterilizados a 120°C durante 30 minutos. Los granos estériles fueron inoculados con tres discos de agar de 0.5 cm de diámetro previamente colonizados por *Agaricus* spp. e incubados a 23°C durante 20 días. La semilla de *S. thermophilum* se preparó con granos de arroz (arroz SOS precocido, S.A. de C.V. Veracruz, México), mezclado con el 2% de CaCO₃, hidratado al 70% y pasteurizado a 110°C durante 15 minutos. El material inoculado se incubó a 45°C durante 4 días.

3.3. Materiales

Para el composteo del sustrato se utilizó un cajón de madera de Tepemixtle (*Ocotea* sp.) de 75 x 75 x 75 cm con 50 agujeros de 0.65 cm de diámetro, distribuidos uniformemente en el fondo del cajón con el fin de proporcionar aireación al sustrato por convección; además de una fila de agujeros a un costado, con una separación entre ellos de 10 cm, éstos para permitir la lectura de temperatura en diferentes partes del cajón (Hernández *et al.*, 2003).

3.4. Preparación del sustrato

3.4.1. Sustrato para pruebas de crecimiento micelial: El sustrato que se utilizó para la determinación de crecimiento micelial de las cepas del género *Agaricus* (ECS-0302, ECS-0305 y ECS-0316) precolonizado por tres cepas del hongo *S. thermophilum* fue pasto pangola *Digitaria decumbens* picado (molino semi-industrial Marca Inisa modelo TH2 500), tamizado (0.5 cm), mezclado con 2% hidróxido de calcio (cal comercial con 82% CaOH, Super Calhidra Grijalva de Cales y Morteros del Grijalva, México) e hidratado (70%), el cual fue colocado en cajas de petri (20g/caja), posteriormente se esterilizó a 120°C durante 30 minutos en autoclave. Se inoculó con un disco de agar de 0.5 cm

previamente colonizado por una de las cepas ECS-0601, ECS-0602 y ECS-0603 e incubado a 45°C durante 4 días.

3.4.2. Sustrato para ensayos de fructificación: Para determinar la eficiencia biológica de las cepas ECS-0302, ECS-0305 y ECS-0316 se empleó pasto pangola *Digitaria decumbens* picado (2 – 2.5 cm), hidratado al 70% y mezclado con 2% hidróxido de calcio (cal comercial con 82% CaOH, Super Calidra Grijalva de Cales y Morteros del Grijalva, México) y el 10% de carbonato de calcio (cal dolomítica con 50-60% de CaCO₃ y 39-47% de MgCO₃ Marca AGROMSA, Guatemala C.A). Este sustrato (950 g) fue colocado en bolsas de polipapel y después pasteurizado a 60°C durante 8 horas en un incubador (Marca Lab-Line Instruments, Mod. 3525). Posteriormente se inoculó con semilla de la cepa *S. thermophilum* ECS-0601 (0.5% de tasa de inoculación) y se incubó a 45 °C durante 4 días.

En las pruebas de cultivo con el uso del cajón de composteo se utilizó el mismo sustrato anterior, pasteurizado a 90°C con vapor durante 60 minutos (Sterilizador Marca Webeco GmbH) y al cual, una vez enfriado a 45°C fue inoculado con semilla de *S. thermophilum* ECS-0601 (0.5%). El composteo se mantuvo durante cinco días.

3.5. Preparación de suplementos

Se utilizaron granos de frijol, garbanzo y soya adquiridos en el mercado local, los cuales fueron triturados (molino manual de nixtamal) y esterilizados a 110°C durante 15 minutos en autoclave.

3.6. Método de cultivo

El método de cultivo empleado para la producción de carpóforos de *A. bisporus* fue el sugerido por Sánchez *et al.* 2006 y se describe a continuación:

Después de pasteurizado, el sustrato se inoculó con una de las cepas de *Agaricus* spp. ECS-0302, ECS-0305 ó ECS-0316 (tasa de inoculación 5%), se colocó en bolsas de polipapel de 30 x40 cm y se incubó durante 3 semanas a 25°C. Se empleó un filtro de papel absorbente durante la etapa de incubación, colocado en la parte superior de la bolsa con la finalidad de facilitar el intercambio gaseoso. Una vez que el sustrato fue colonizado por el hongo, se retiró el filtro de papel y se aplicó la tierra de cobertura, que consistió en una mezcla de turba (Marca Premier Horticultura Inc., USA), cal dolomítica y agua en una relación 1:1:2 y se llevó a un cuarto de fructificación a 16 °C y 90% de humedad ambiental durante 30 días. Se aplicó riego diariamente. Al momento de añadir la tierra de cobertura se hizo una aplicación de suplemento nitrogenado a base de soya, frijol o garbanzo (Tabla 5 y 6).

Para el caso del sustrato composteado, diariamente durante el desarrollo del composteo (0-5 días), se tomaron tres alícuotas del centro de la composta, de 950 g de sustrato cada una (en bolsa de polipapel de 30 x 40 cm), se les dejó enfriar a temperatura ambiente, se inocularon con 50 g de semilla de *A. bisporus* ECS-0305, se embolsaron y se incubaron durante 3 semanas a 25°C. Posteriormente se aplicó la tierra de cobertura y se pusieron en condiciones de fructificación a 16°C, humedad ambiental entre 80 y 90%, oscuridad y riegos frecuentes, como lo sugieren Sánchez *et al.* 2006.

3.7. Tratamientos

Etapa 1a) Se evaluó el crecimiento micelial de las tres cepas de *S. thermophilum* en dos medios sintéticos y el sustrato pasto pangola *D. decumbens*.

Etapa 1b) Se evaluó el crecimiento micelial de *Agaricus* spp., en presencia de tres cepas de *S. thermophilum* de acuerdo a los tratamientos que se observan en la Tabla 4.

Etapa	Precolonización (cepa de <i>S. thermophilum</i> cuya TEL se evalúa)	Colonización (Cepa de <i>Agaricus</i> spp. cuya TEL se evalúa)
Cepa evaluada	ECS-0601	ECS-0302 ECS-0305 ECS-0316
	ECS-0602	ECS-0302 ECS-0305 ECS-0316
	ECS-0603	ECS-0302 ECS-0305 ECS-0316

Tabla 4 Distribución de tratamientos para la determinación de la Tasa de extensión lineal de las tres especies de *Agaricus* spp. en pasto pangola precolonizados por tres cepas de *S. thermophilum*.

Etapa 2) Preparación de un sustrato composteado en condiciones semicontroladas:

Cepas: *S. thermophilum* ECS-0601 (inoculada al inicio del composteo) y *A. bisporus* ECS-0305 (inoculada sobre muestras de 0.95 kg de sustrato tomado diariamente de la composta en proceso).

Sustrato: Pasto pangola *Digitaria decumbens* adicionado con el 2% de cal comercial y 10% de cal dolomítica.

Cantidad de sustrato inicial: 40 ó 60 kg, según se indica.

Recipiente de composteo: Cajón de madera de 75 cm por lado

Tratamiento: Composteo por 5 días, con remoción al tercer día.

Variables evaluadas: Eficiencia biológica de *A. bisporus* y
Velocidad de crecimiento de *A. bisporus*

Etapa 3) Evaluación de suplementos

Se realizó un ensayo preliminar con cuatro suplementos proteicos: soya, garbanzo, frijol y salvado como se muestra en la Tabla No 5. En donde (+) significa presencia del ingrediente y (-) la ausencia del suplemento.

Tratamiento	Patrón	Soya	Frijol	Garbanzo	Salvado
1	++--	1	1	-1	-1
2	--++	-1	-1	1	1
3	-++-	-1	1	1	-1
4	++++	1	1	1	1
5	+--+	1	-1	1	-1
6	+--+	1	-1	-1	1
7	----	-1	-1	-1	-1
8	-+-+	-1	1	-1	1

Tabla 5 Distribución de tratamientos para la evaluación de cuatro suplementos proteicos.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba, se determinó un segundo ensayo en el cual se evaluaron como suplementos, granos triturados de soya, frijol y garbanzo, solos o en mezclas, con una tasa total de suplementación del 6% (Tabla 6).

Tratamientos	Soya	Garbanzo	Frijol
1	0.33	0.33	0.33
2	0	1	0
3	0.5	0.5	0
4	0.33	0.33	0.33
5	0	0.5	0.5
6	0.5	0	0.5
7	1	0	0
8	0	0	1

Tabla 6 Composición de las mezclas de suplementos proteicos utilizadas para evaluar la EB de *A. bisporus* ECS-0305 en un sustrato precolonizado por *S. thermophilum* ECS-0601. Suplemento total aplicado en todos los casos, 6%.

3.8. Parámetros a medir

Los parámetros evaluados fueron determinados de la siguiente manera:

3.8.1. pH

Se realizó una suspensión de la muestra con 10 g del sustrato en 25 ml de agua destilada, se dejó reposar durante 15 minutos y se determinó el pH con un potenciómetro pH/ISEmeter modelo 710A marca Orion.

3.8.2. Humedad del sustrato

Se tomaron cinco gramos de muestra y se colocaron en una termobalanza Moisture analyzer A&D M.F. 50

3.8.3. Temperatura

Se realizaron lecturas de la temperatura durante los cinco días del composteo. Para ello se introdujo un termómetro de mercurio en tres partes, a un costado, del cajón de composteo (a 10 cm debajo de la superficie, al centro y 10 cm encima del fondo de la masa en proceso).

3.8.4. Tasa de extensión lineal (TEL)

El sustrato previamente colonizado por una de las cepas de *S. thermophilum* (ECS-0601, ECS 0602 o ECS 0603) fue colocado estérilmente en tubos de ensaye de 18 x 21cm que contenían en el fondo una semilla de una de las cepas de *Agaricus* spp. por evaluar. Después se incubaron a 25 °C durante 20-25 días. El crecimiento micelial se midió cada dos días y fue comparado contra el crecimiento del hongo en un sustrato sin *S. thermophilum*. La tasa de extensión lineal se obtuvo mediante el cálculo de la pendiente según la siguiente fórmula:

$$TEL = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

En donde X es el tiempo (días) y Y es la medición del radio del crecimiento de la colonia (mm) durante el tiempo.

La evaluación del crecimiento de *A. bisporus* en el sustrato composteado, debido al mayor tamaño de partícula de éste, no se hizo en tubos, como previamente se explica, sino en caja de petri, a las cuales se les adicionaron 16 g del sustrato tomados del composteo en curso (0-6 días) y se colocó un grano de inóculo de *A. bisporus* en el centro de la caja, Las cajas se incubaron a 25 °C durante 20 días. El radio micelial se midió cada cinco días y se determinó la velocidad de crecimiento con la misma formula anterior.

3.8.5. Eficiencia biológica

La eficiencia biológica (EB) se determinó mediante la formula:

$$EB = \frac{X}{Y} * 100$$

En donde X es el peso de los cuerpos fructíferos frescos cosechados y Y el peso seco del sustrato empleado (Guzmán *et al.*, 1993).

3.8.6. Diseño experimental

Para determinar el efecto de las tres cepas de *S. thermophilum* sobre el crecimiento de *Agaricus* spp. se aplicó un diseño bifactorial desbalanceado, con al menos 24 repeticiones, en el cual los factores fueron las cepas del género *Agaricus* (A) y las cepas de *S. thermophilum* (B). Para los ensayo de producción de carpóforos de la cepa ECS-0305 en el sustrato precolonizado por ECS-0601 se aplico un diseño completamente al azar, en el cual los tratamientos fueron los cinco días de duración del proceso de composteo. Para los ensayos de suplementación se utilizó un diseño factorial con tres suplementos y tres niveles de suplementación.

3.8.7. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia de (0.05). Para ello se utilizó el paquete estadístico JMP 4.0 de SAS. (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 1998) y STATISTICA V 6.1 (StatSoft, Inc., 2004).

4. RESULTADOS

5.1 Influencia de *S. thermophilum* sobre la velocidad de crecimiento micelial de cepas del género *Agaricus* spp. a nivel de laboratorio

5.1.1 Caracterización del crecimiento de las cepas de *S. thermophilum*

Las tres cepas de *S. thermophilum* evaluadas presentaron un crecimiento micelial algodonoso y de color blanco con algunas diferencias en cuanto a la esporulación: las cepas ECS-0601 y ECS-0602, comenzaron su fase reproductiva aún dentro de la estufa a los tres días de inoculadas, y mostraron una coloración gris oscuro y gris claro, respectivamente; a diferencia de la cepa ECS-0603 que tardó 4 días en colonizar el medio de cultivo y comenzar su fase reproductiva después de este tiempo, ya fuera e la estufa a temperatura ambiente por lo que presentó una coloración blanquecina con ligeras tonalidades oscuras (Figura 2). La cepa ECS-0601 presentó conidios globosos elipsoidales de color café; la ECS-0602 presentó esporas globosas de color café oscuro y finalmente la cepa ECS-0603 esporas, de globosas a elipsoidales, de color marrón. En el medio a base de almidón con sales minerales de potasio y magnesio se observó para las tres cepas del hongo termofílico un crecimiento micelial más denso y el inicio de la fase de esporulación más rápido que en el medio de LPDA y el pasto pangola.

El tiempo de colonización del sustrato bajo condiciones controladas de temperatura (45°C) fue diferente en función de la cepa utilizada. Las cepas ECS-0601 y ECS-0602 colonizaron la caja de petri en tres días, no siendo así para la cepa ECS-0603, que la colonizó en cuatro días en pasto pangola. La Tabla 7 presenta la TEL de las tres cepas en tres medios de cultivo. Los valores obtenidos variaron entre 1.51 cm/d (ECS-0603 sobre LPDA) que fue la velocidad más baja, y 3.76 cm/d (ECS-602 sobre pasto) que fue la más alta. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las cepas, entre los sustratos utilizado y en la interacción de ellos ($p= 0.05$).



Figura 2. Aspecto de las tres cepas de *S. thermophilum* estudiadas. Medio de Cultivo: Extracto de levadura (0.4%)-Almidón (15%)-MgSO₄ (0.05%)-2K PO₄ (0.1%)-Agar (1.5%); pH 7.5, incubación a 45°C. Cepas ECS-0601y ECS-0602 a 3 días de crecimiento, ECS-0603 a 4 días de crecimiento.

	TEL (cm/d)								
	ECS0601	Desv. Est.		ECS 0602	Desv. Est.		ECS 0603	Desv. Est.	
pasto	3.59	0.35	a*	3.76	0.22	a	1.97	0.17	c
LPDA	2.82	0.18	b	2.85	0.11	b	1.51	0.10	b
Almidon	2.50	0.18	b	3.69	0.12	a	2.91	0.03	a

Tabla 7 Tasa de Extensión Lineal de tres cepas de *S. thermophilum* en dos medios sintéticos y pasto pangola *D. decumbens* adicionado con 2% de cal (45°C).

* Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadística entre ella a un nivel $\alpha=0.05$

5.1.2 Interacción *S. thermophilum*/*A. bisporus*

Al sembrar las cepas de *Agaricus* spp., no se observaron cambios o diferencias en cuanto a la apariencia física del micelio de *S. thermophilum*. Es decir, se mantuvo la colonización densa y blanca, y tampoco se observó cambio alguno en el aspecto de los basidiomicetes evaluados. Las tres especies de *Agaricus* mostraron una activación micelial a los dos – tres días de inoculadas en el sustrato precolonizado por alguna de las cepas de *S. thermophilum*, se observó un fase de adaptación del micelio y posteriormente un crecimiento rápido. La cepa *A. subrufescens* ECS-0302 presentó un crecimiento micelial esparcido, mientras que *A. bisporus* ECS-0305 y *A. bitorquis* ECS-0316 lo presentaron más denso y algodonoso.

La tasa de extensión lineal (TEL) de *Agaricus* spp. sobre pasto pangola precolonizado por tres cepas de *S. thermophilum* y como testigo las cepas solas del género *Agaricus* evaluadas, se muestra en la Figura 3. La cepa *A. bisporus* ECS-0305 presentó una TEL similar cuando creció en presencia de la cepa *S. thermophilum* ECS-0601 (0.21mm/d) y ECS-0603 (0.20 mm/d) no así con ECS-0602 (0.18mm/d) donde el crecimiento fue más lento ($\alpha= 0.05$). La especie *A. subrufescens* ECS-0302 presentó velocidades de crecimiento micelial similares en el sustrato precolonizado por las cepas ECS-0602 (0.22 mm/d) y ECS 0601 (0.20 mm/d), a diferencia de un crecimiento más lento con ECS-0603 (0.19 mm/d). Finalmente *A. bitorquis* ECS-0316 fue la cepa que mostró las menores TEL con valores de 0.12 mm/d (ECS-0601), 0.11 mm/d (ECS-0602) y, 0.10 mm/d (ECS-0603). De manera general las tres cepas del género *Agaricus* presentaron un crecimiento variable entre 1.4 – 0.9 mm/d sobre el sustrato sin colonización previa de alguna de las cepas de *S. thermophilum*.

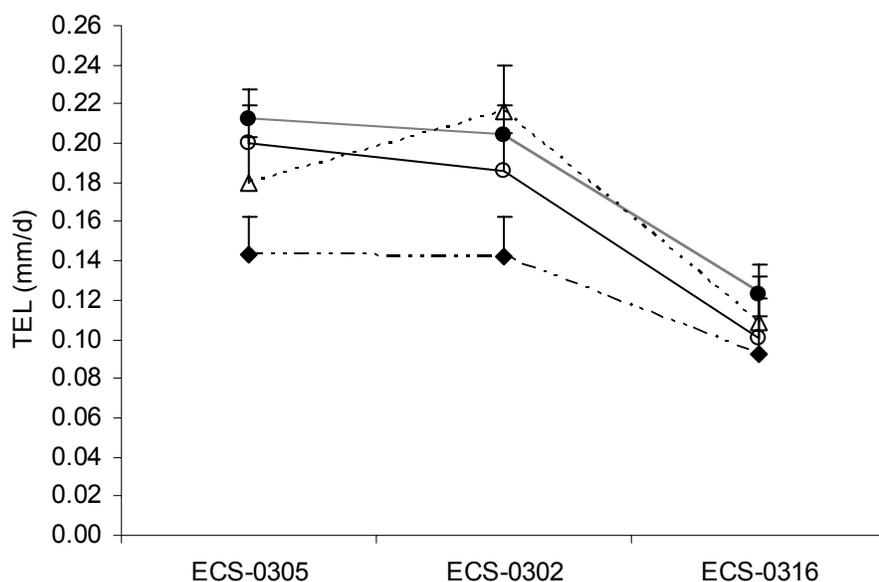


Figura 3. Crecimiento micelial de *Agaricus* spp. solos y en presencia de tres cepas de *S. thermophilum*. Sustrato: Pasto pangola *Digitaria decumbens* con 2% de Cal, temperatura 23°C incubación 21 días.

---◆--- Testigo ---◆--- E CS-0601 ---△--- E CS-0602 ---○--- E CS-0603

5.2 Viabilidad técnica de un método de cultivo de *A. bisporus* sobre un sustrato no composteado colonizado por *S. thermophilum*

5.2.1 Evolución de parámetros fisicoquímicos de la composta

Primeramente se hicieron dos ensayos de composteo utilizando 60 kg de sustrato inicial, sin embargo estos ensayos fracasaron porque al tercer día de composteo la temperatura de la masa en proceso superó los 50°C, volviéndose inviable para el crecimiento de *S. thermophilum*. Por esta razón, se hicieron dos ensayos más utilizando 40 kg de sustrato inicial y una altura máxima de la pila de 40 cm, y en los cuales las condiciones fisicoquímicas del sustrato fueron más adecuadas para el crecimiento de *S. thermophilum*, como se observa en la Figura 4.

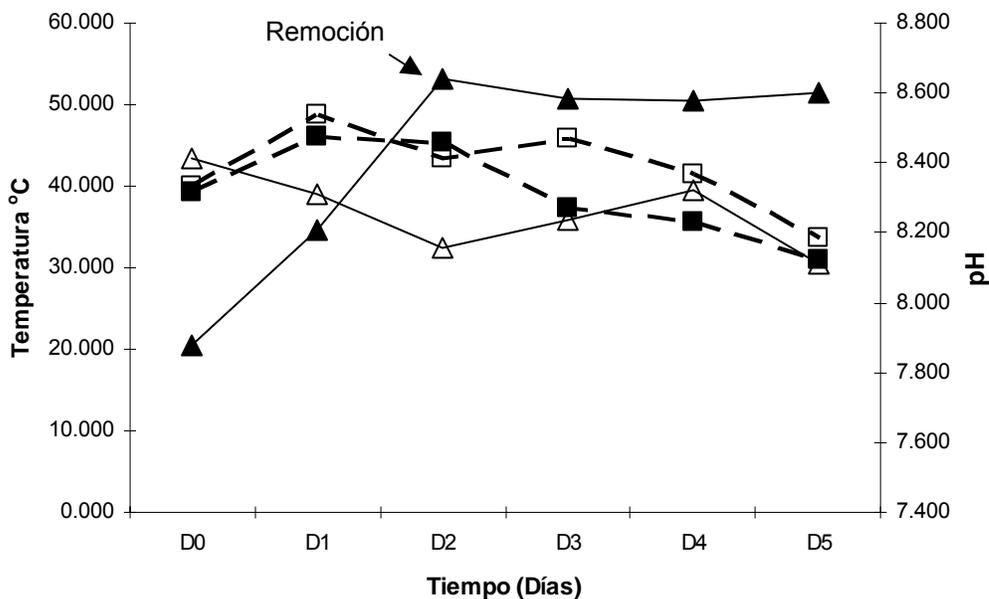


Figura 4 Evolución del pH y la temperatura del sustrato, pasto pangola *Digitaria decumbens* con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, durante un composteo de dos días con la cepa *S. thermophilum* ECS-0601.

—□— Temp60kg —■— Temp40 —▲— pHT60kg —△— ph40kg

En las Figuras 4 y 5 se presenta la evolución de la temperatura, pH y humedad del sustrato durante los cinco días de composteo. Se observa que la temperatura en el cajón con 60 kg alcanzó valores superiores a los 50°C al día 1 (D1, 24 horas de composteo) de haber iniciado el proceso y, al D2 (48 h, día en que se remueve el sustrato), debido a una gran actividad microbiana. Se observa también una elevación del pH de 7.8 a 8.6. La humedad disminuyó de 68 al 66%. Esto ocasionó que *S. thermophilum* no se estableciera ni colonizara el sustrato y que organismos competidores como actinomicetos y *Aspergillus fumigatus*, entre otros, crecieran mayoritariamente en la masa en proceso. Por el contrario, las experiencias realizadas con 40 kg de sustrato permitieron una evolución más satisfactoria de la temperatura: los valores observados no excedieron de 46°C durante ningún día del proceso, con valores de pH de 8.4 a 8.1; aunque se observó una mayor pérdida de humedad (de 67 a 61%). La Figura 6 muestra el aspecto del sustrato en curso de composteo y la colonización gradual realizada por *S. thermophilum*.

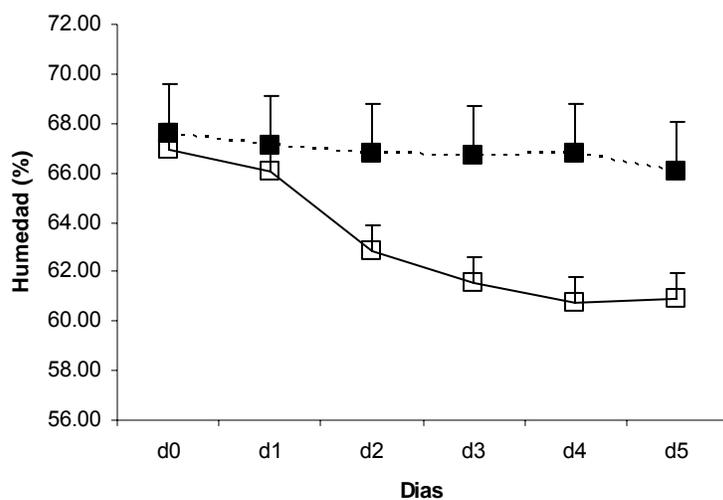


Figura 5 Humedad en el sustrato, pasto pangola *Digitaria decumbens* con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, durante el composteo por *S. thermophilum* ECS-0601. ---■--- Hum T1 —□— Hum T2

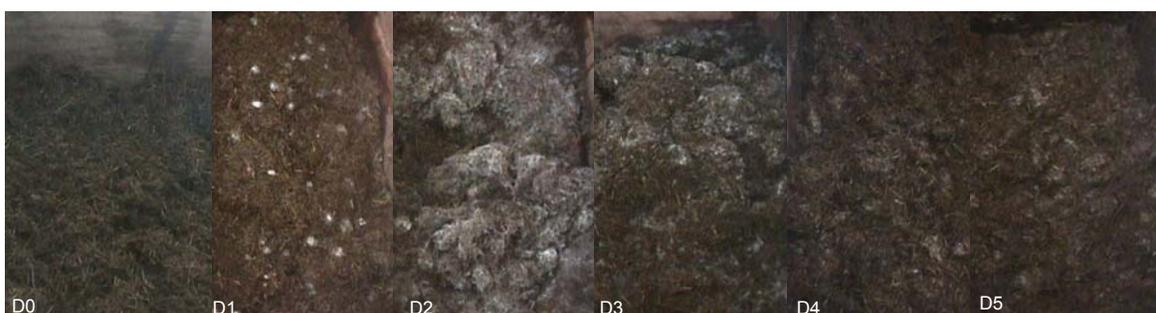


Figura 6 Evolución de la colonización del sustrato, pasto pangola *D. decumbens* con 2% de cal y 10% de cal dolomítica, por *S. thermophilum* ECS-0601 durante los cinco días del proceso de composteo en un cajón de madera.

5.2.2 Tasa de extensión lineal de *A. bisporus* ECS-0305 sobre pasto pangola tomado de la composta en proceso

En las Figuras 7 y 8 se presenta el crecimiento de *A. bisporus* ECS-0305 sobre el pasto pangola tomado como muestra diariamente de la composta en proceso. La figura 7 muestra cuando se compostearon 60 kg de sustrato, los promedios de la TEL varían de 0.84 a 0.158 mm/d, siendo el valor mínimo para el D0 y el valor máximo para el D4, la comparación de medias por el método de Toker-Kramer al 0.05% indica que no existe diferencia significativa entre los tratamientos. En la Figura 8, cuando se compostearon, 40 kg, se observó un incremento en la tasa de crecimiento micelial, ya que las TEL de D1, D2, D3 y D4 presentaron un promedio de 0.331, 0.329, 0.323 y 0.227 mm/d respectivamente, superiores y diferentes estadísticamente (según las pruebas de Tukey y Student), que los obtenidos con el sustrato D0 y D5 (0.185 y 0.125 mm/d respectivamente).

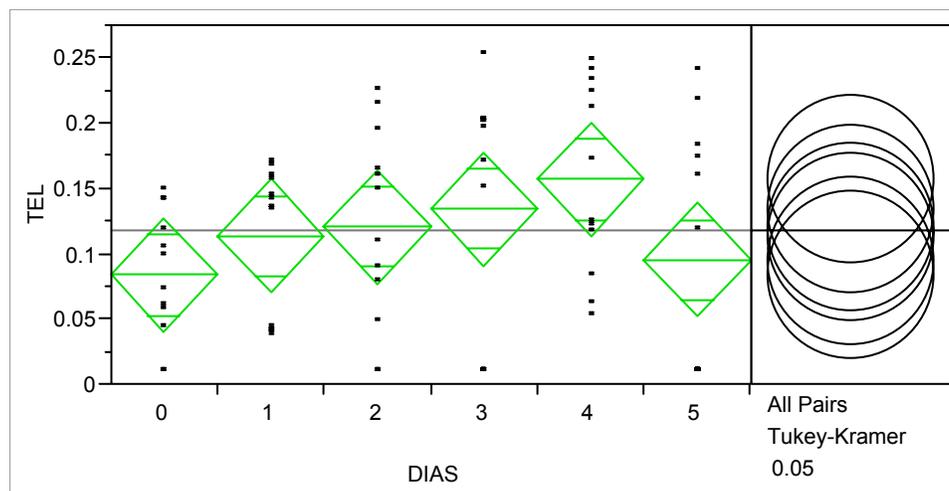


Figura 7 Tasa de extensión lineal (TEL) de *A. bisporus* ECS-0305 sobre 60 kg de pasto Pangola *Digitaria decumbens* composteado por *S. thermophilum* ECS-0601.

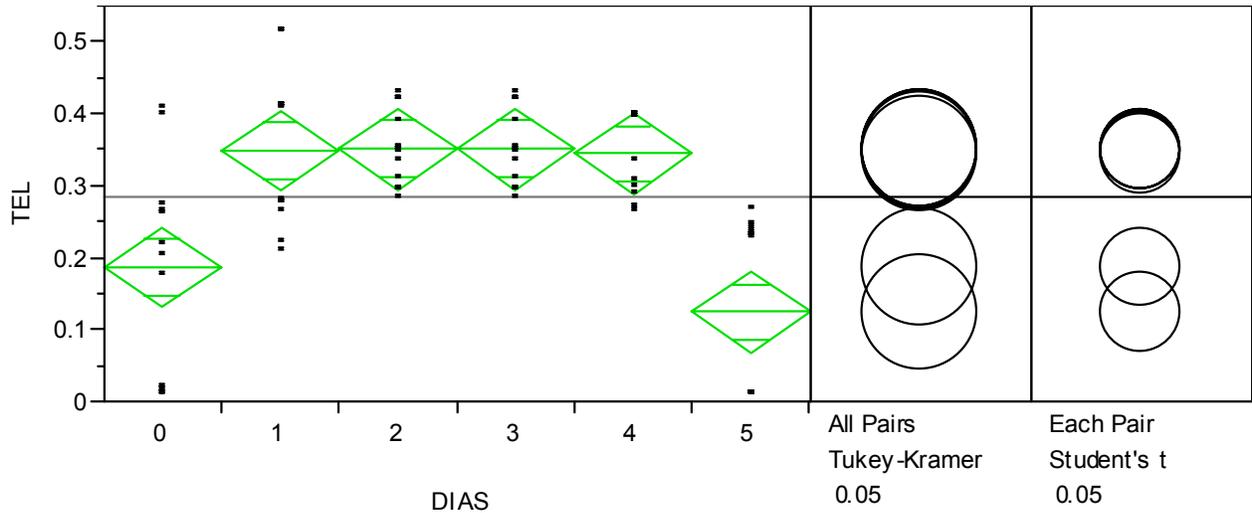


Figura 8 Tasa de extensión lineal (TEL) de *A. bisporus* ECS-0305 sobre 40 kg de pasto *Pangola Digitaria decumbens* con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, composteado por *S. thermophilum* ECS-0601.

5.2.3 Producción de carpóforos

En la Figura 9 se muestra la producción de carpóforos (EB) obtenida con las muestras de sustrato en curso de composteo (composteo con 60 kg de sustrato) e inoculadas con *A. bisporus*. En ella se muestran valores de EB del 20% (D4) y 7% (D0), El análisis estadístico indicó que no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

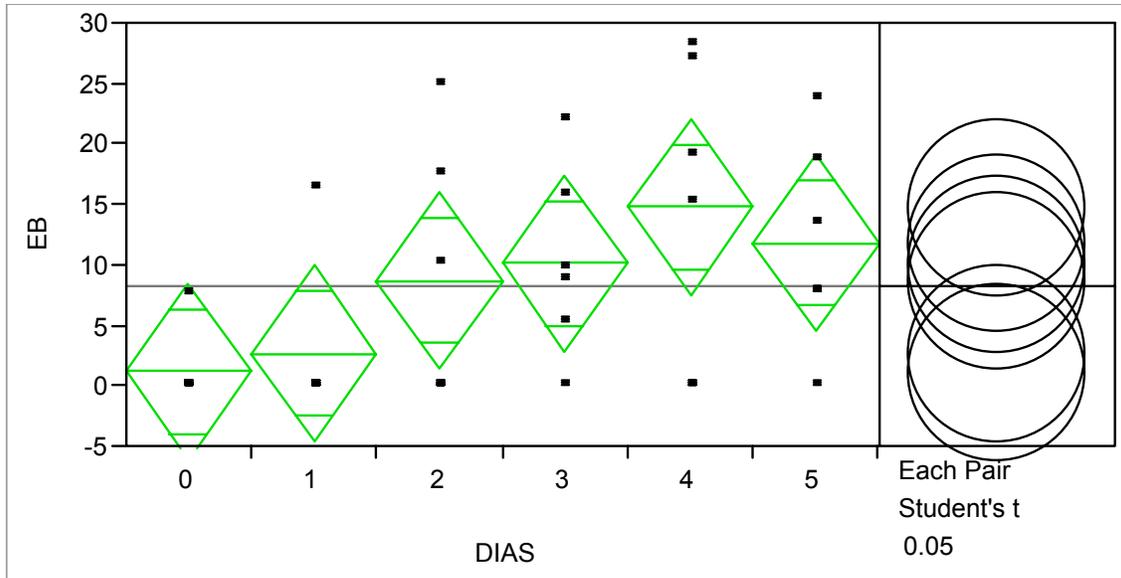


Figura 9 Eficiencia biológica de *A. bisporus* ECS-0305 sobre pasto *Pangola D. decumbens* con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, composteado con *S. thermophilum* ECS-0601. Cantidad inicial de sustrato 60 kg.

La EB obtenida con el sustrato composteado en el cajón de madera cuando se usaron 40 kg de sustrato inicial se muestra en la Figura 10. La capacidad de *S. thermophilum* para crecer en pasto pangola (3.5 cm/d) se manifiesta con una mejora de la colonización al D1 y una colonización completa en el D2. Los valores de EB obtenidos variaron entre 35 y 79%. El análisis estadístico (para un $\alpha= 0.05$) señaló que el composteo de 1 a 4 días produce EB similares y que un composteo de 2-3 días es mejor que un composteo de cinco. El tratamiento D0 no produjo carpóforos en razón de que resultó contaminado por hongos verdes del género *Trichoderma*.

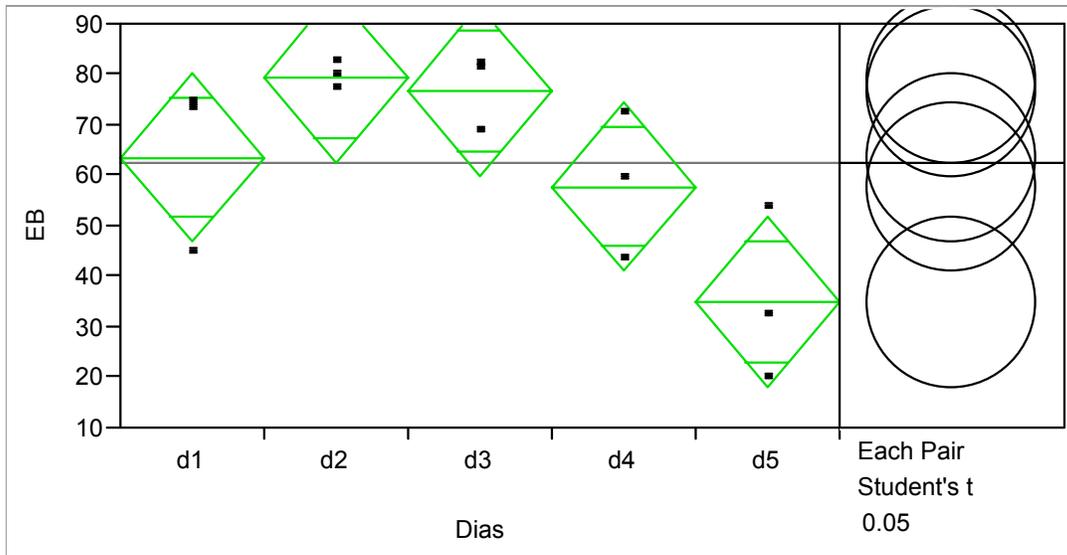


Figura 10 Determinación de la Eficiencia biológica de *A. bisporus* ECS-0305 sobre 40 kg de pasto *Pangola Digitaria decumbens* con 2% de cal y 10 % de cal dolomítica, composteado por *S. thermophilum* ECS-0601.

5.3 Ensayo de suplementación

Se hizo un ensayo preliminar con cuatro suplementos que fueron el salvado de trigo y los granos triturados de soya, garbanzo y frijol en una dosis única de suplementación (5%). Todos los tratamientos obtuvieron fructificaciones y la primera cosecha se obtuvo en los días señalados a continuación, después de la siembra: día 50 (T3, T1, T5 y T7) y día 53 (T2, T4, T6 y T8). La Tabla 8 muestra las eficiencias biológicas obtenidas. Se observa que la mezcla frijol-garbanzo presentó una EB del 40%, estadísticamente igual que el tratamiento testigo (sustrato precolonizado por ECS0-601, sin suplemento) con un valor del 38%. Los menores valores de EB, estadísticamente diferentes de todos los demás, fueron los obtenidos por las mezclas que contenían salvado, en los cuales fue notoria la incidencia de contaminantes del género *Trichoderma*.

Tratamiento	Soya	Frijol	Garbanzo	Salvado	EB	Desv Est
1	1	1	-1	-1	31.51	31.2
2	-1	-1	1	1	7.19	7.9
3	-1	1	1	-1	40.08	41.7
4	1	1	1	1	4.30	
5	1	-1	1	-1	26.53	32.6
6	1	-1	-1	1	8.03	
7	-1	-1	-1	-1	38.14	49.9
8	-1	1	-1	1	4.92	11.0

Tabla 8 EB de *A. bisporus* ECS-0305 del ensayo de suplementación con cuatro suplementos proteicos en pasto pangola *D. decumbens* con el 2% de cal y 10% de cal dolomítica, precolonizado por *S. thermophilum* ECS-0601.

5.4 Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus*

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo preliminar se llevo a cabo una segunda evaluación de tres suplementos proteicos, que fueron frijol, garbanzo y soya aplicados solos o en mezclas en una dosis total máxima de suplemento del 6%. La Figura 11 muestra la influencia de los tres suplementos sobre la eficiencia biológica de *A. bisporus*. Los valores obtenidos variaron entre 74% (T7) y 50% (T2 y T3). El análisis estadísticos mostró que no hubo una diferencia estadística significativa entre ellos para una $\alpha= 0.05$.

Tratamientos	1	2	3	PROMEDIO	EB	Desv Est.
T1	213.00	165.00	166.00	181.33	60.44	27.43
2	208.00	121.00	125.00	151.33	50.44	49.12
3	136.00	218.00	98.00	150.67	50.22	61.33
4	218.00	172.50	195.25	195.25	65.08	22.75
5	233.00	167.00	174.00	191.33	63.78	36.25
6	158.00	159.00	232.80	183.27	61.09	42.90
7	166.00	166.00	337.00	223.00	74.33	98.73
8	169.00	145.80	238.00	184.27	61.42	47.96

Tabla 9 Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus* ECS-0305 sobre pasto *Pangola Digitaria decumbens* con el 2% de cal comercial y 10% de cal dolomítica composteado por *S. thermophilum* ECS-0601.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó el crecimiento micelial de tres cepas de *S. thermophilum*, el crecimiento de tres cepas de *Agaricus* spp. y el crecimiento de estas últimas en presencia de las cepas de *S. thermophilum*. Así mismo, se evaluó la viabilidad técnica de un método alternativo de cultivo de *A. bisporus* a escala semicomercial, que no emplea la fase I de composteo y, finalmente, se probaron tres suplementos proteicos para evaluar el incremento en la eficiencia biológica de *A. bisporus* cultivado por este mismo método no tradicional.

Influencia de *S. thermophilum* sobre el género *Agaricus*

Las tres cepas evaluadas crecieron bien sobre los medios utilizados (pasto, almidón y PDLA) y, acorde con Sánchez *et al.* 2006, el pasto pangola resultó ser un sustrato muy bueno para dos de ellas (TEL del orden de 3.59 ± 0.35 cm/día para ECS-0601 y 3.76 ± 0.22 cm/día para ECS-0602). Estas elevadas velocidades de crecimiento a 45°C son características de esta especie y han sido reportadas por diversos autores (Straastma *et al.* 1994^a, Wiegant 1992). Por otra parte, las diferencias observadas entre las cepas en cuanto a morfología micelial y crecimiento cayeron dentro de los rangos reportados por Straastma *et al.* 1994b, Straastma y Samson 1997, quienes evaluaron más de 30 aislamientos del complejo *Torula-Humicola* obtenidos principalmente de compostas para producción de hongos y reportaron rangos similares para ellas. Las tres cepas del deuteromiceto tuvieron un efecto variable, pero positivo, sobre el crecimiento de las cepas de *Agaricus* spp. Así, se observó una estimulación promedio del crecimiento de 140 % para ECS-0305, de 145% para ECS-0302, y de 122% para ECS-0316. Estos estudios demuestran que la interacción *S. thermophilum/Agaricus* spp. /medio de cultivo es muy importante, y debe ser estudiada más a detalle para mejorar el crecimiento y la fructificación de *Agaricus* spp.

Straastma *et al.* 1989 obtuvieron un crecimiento lineal de 4 mm/día para *A. bisporus* en compostas estériles y de 8 mm/día en composta precolonizada por *S. thermophilum*, por lo que pudiera decirse que las velocidades observadas en este estudio con las cepas del género *Agaricus* son bajas. Es conveniente notar sin embargo, que en este caso el sustrato empleado era un sustrato crudo, no composteado y no contenía ningún tipo de estiércol.

Los resultados obtenidos van de acuerdo con lo reportado por Op den Camp, *et al.* 1990, quienes mencionan que la presencia de *S. thermophilum* es importante para la colonización de *A. bisporus* en el sustrato y que con la precolonización del hongo termofílico se obtiene un medio selectivo. Estos autores describieron la interacción entre estos hongos como una relación competitiva, neutralista y mutualista, en donde *A. bisporus* es clasificado como un competidor-combativo de *S. thermophilum*.

En este trabajo se demostró que el efecto estimulante que ejerce *S. thermophilum* sobre el crecimiento no solamente se da en el caso de *A. bisporus*, como ha sido reportado hasta la fecha (Op den Camp *et al.* 1990; Straastma *et al.* 1991, 1994^a, 1994b), sino que también afecta otras especies del género, como las especies estudiadas: *A. bitorquis* y *A. subrufescens*. El elemento que causó dicha estimulación no ha sido determinado con claridad y se le atribuye a una reducción en el contenido de amonio en el sustrato, un incremento en la selectividad de la composta (Ross and Harris 1983), el desprendimiento de CO₂ (Wiegant *et al.* 1992) y la inmovilización de nutrientes (Fermor y Wood 1981). Así también, con base en una variabilidad observada en la velocidad de crecimiento en función de la manera de incubar las cajas de petri de *A. bisporus* en el curso de nuestros experimentos, es posible que un compuesto no definido, volátil, producido durante el crecimiento de *S. thermophilum* tuviera alguna relación importante. Este es un tema que deberá ser estudiado en el futuro.

Viabilidad técnica de un método de cultivo de *A. bisporus* sobre un sustrato colonizado por *S. thermophilum*

En este trabajo se confirmó lo expresado por Sánchez *et al.* 2006, quienes obtuvieron fructificaciones de *A. bisporus* al usar un sustrato (pasto pangola-cal), pasteurizado por 8 horas a 60°C. Las eficiencias biológicas aquí obtenidas son ligeramente inferiores a las reportadas por ellos, sin embargo comparables (40 y 48%, respectivamente).

Así mismo se demostró que es posible sustituir la incubación controlada a 45°C en un incubador, por un tratamiento de composteo que puede variar entre 1 y 5 días, con un óptimo de 2-3 días. Esta sustitución indujo un incremento en el valor de la eficiencia biológica obtenida, (de 40% con pasteurización en incubador a 79% composteado). Este

incremento puede atribuirse e al efecto de la microbiota nativa que intervino durante el composteo. En efecto, *S. thermophilum* no es el único organismo termofilico que interviene positivamente en la preparación de un sustrato selectivo para *A. bisporus*: Straatsma (1994) señaló que, después de realizar un estudio de la ecología de la población fúngica termofilica en la composta para cultivar champiñones, nueve especies de hongos promovieron el crecimiento micelial de *A. bisporus*: *Chaetomiun thermophilum*, *Chaetomiun* sp., *Malbranchea sulfurea*, *Myriococcum thermophilum*, *Scytalidium thermophilum*, *Stilbella thermophila* *Thielavia terrestres* y dos basidiomicetes. Este autor mencionó también que la densidad de *S. thermophilum* estuvo correlacionada positivamente con la producción de hongos y estimuló fuertemente el crecimiento micelial.

Los valores de eficiencia biológica obtenidos al compostear el sustrato variaron entre 35 y 79%, según la duración del proceso. Los valores obtenidos con 2 y 3 días de composteo representan ya una producción aceptable en términos comerciales (50-70%) (Schisler 1982) y cercana a los valores obtenidos por otros autores con sustratos no composteados (66-96% García *et al* 2005, 30- 71% Sánchez *et al.* 2002).

La pasteurización a 60 °C por 8 horas o con vapor por una hora a 90°C más dos días en cajón de madera, con un espesor de capa o altura de la composta de 40 cm, (para evitar temperaturas mayores a 50°C, lo que equivale a una fase II breve para el crecimiento de *S. thermophilum*), representa un acortamiento del proceso tradicional de 2 fases, ya que resulta en un proceso con duración de 3 días, en lugar de los 20-25 días que dura el método tradicional (Wuest, 1982) y es por lo tanto una simplificación del proceso, que haría el cultivo del champiñón accesible a las áreas rurales del país.

Los ensayos con 40 y 60 kg de sustrato inicial permitieron identificar la importancia de la cantidad de masa y la altura de la pila de sustrato que se compostea; sin embargo, el tiempo y la cantidad de masa aquí determinados no son absolutos ni definitivos, ya que se deben adecuar para cada localidad, en razón de la variación climática (altitud, temperatura, humedad, principalmente y sustrato utilizado), pero sí dejan en claro que es posible mantener de una manera sencilla temperaturas adecuadas para el crecimiento de *S. thermophilum* y que el mantenimiento de temperaturas inferiores a 50°C contribuyen a la

formación de una composta selectiva, debido al establecimiento y crecimiento de *S. thermophilum*. Así al D1 era evidente el desarrollo micelial a partir del inóculo de arroz y para D2 la colonización del sustrato era completa. Las producciones de carpóforos obtenidas demostraron que el método de producción es viable y que mediante el manejo adecuado de la temperatura y la humedad del sustrato es posible producir *A. bisporus* de manera comercial.

Durante D1- D5, la acción conjunta de *S. thermophilum* y algunos otros microorganismos, como actinomicetes, que se presentan de manera común durante el composteo, contribuyeron seguramente a la degradación de moléculas complejas y a la formación de otras más, que permitieron el desarrollo del micelio de *A. bisporus* (Harvey 1982). Esta situación se dio necesariamente de manera diferente en D0, en donde el sustrato solamente se encontraba pasteurizado “crudo” y *A. bisporus* no encontró la selectividad suficiente para colonizarlo adecuadamente. Esto explica el por qué de la contaminación con hongos no deseados en este día de proceso. Straastma 1989 y Wiegant 1992, señalan que *S. thermophilum* funge como un acondicionador del sustrato y permite la disponibilidad de nutrientes para el micelio de *A. bisporus* y además el micelio del hongo termofílico permite que disponga de nutrimentos extras ricos en proteínas y lípidos provenientes de las membranas celulares.

Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus*

Sinden y Schisler 1962, introdujeron la suplementación al momento de añadir la tierra de cobertura, esto es, cuando la composta estaba bien colonizada por *A. bisporus*, alrededor de 21 días después de la siembra. Estos autores reportaron que en ese momento los suplementos pueden ser aplicados ventajosamente en tasas mayores al 10% del peso seco de la composta sin que se presenten hongos contaminantes. Los ensayos realizados en este trabajo demostraron que la adición de suplementos acortó el ciclo de cultivo, ya que los tratamientos suplementados presentaron su primera cosecha a los 40- 42 días posteriores a la aplicación de la tierra de cobertura, mientras que el testigo sin suplemento lo hizo a los 50 días; Sin embargo, una mayor EB por efecto de los suplementos no fue observada, ya que el análisis estadístico no señaló diferencias significativas entre tratamientos. Aunque al

hacer el análisis del efecto de cada suplemento sobre la producción, se vieron ciertas tendencias a favor de la soya y el frijol triturado, los coeficientes de variación encontrados no pudieron confirmar la validez de esas tendencias. Es necesario realizar más estudios sobre el efecto de suplementos ensayos para poder concluir en este sentido.

Durante la evaluación de los cuatro suplementos proteicos, soya, garbanzo, frijol y salvado se presentó una incidencia de contaminantes atribuible a deficiencias en el momento de aplicación del suplemento. Esto debido a que al incorporar el suplemento fue necesario manipular el sustrato ya colonizado por *A. bisporus*, para fragmentarlo y para distribuir homogéneamente el suplemento. Esta operación no se aplicó, por razones obvias, al testigo, el cual no presentó ninguna contaminación. Probablemente una aplicación más meticulosa del suplemento hubiera permitido poner en evidencia el efecto de los suplementos.

Bechara *et al.* (2005) demostraron que *A. bisporus* puede ser cultivado con una eficiencia biológica extraordinariamente alta (160%) al utilizar un sustrato no composteado (centeno estéril), con un suplemento nitrogenado aplicados sobre una cama de perlita como reserva de agua. Estos autores hicieron énfasis sobre la importancia del suplemento, pues su aplicación hizo pasar los rendimientos de 1.46 kg /m² a 10.25 kg /m².

Por su parte, Vijay, 2002, indicó que la suplementación es más benéfica durante la adición de tierra de cobertura, debido probablemente a que los nutrientes extras suministrados son directamente utilizados por el micelio del hongo para incrementar la producción; mientras que la suplementación antes de la incubación comúnmente es asociada con la elevación de la temperatura y la incidencia de enfermedades.

Más estudios sobre el efecto de la suplementación son necesarios porque los aquí presentados no son concluyentes. Entre ellos, probar nutrientes de disponibilidad retrasada ya que éstos has sido reportados como muy eficientes para incrementar la producción de *A. bisporus* porque, al ser tratados con formaldehído, los suplementos proteicos suministrados presentan una forma más disponible y por otra parte, el formaldehído induce un aprovechamiento gradual del suplemento por el hongo (Carroll y Schisler, 1974; Vijay, 2002).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como resultado de este trabajo se concluye que:

- Las cepas de *S. thermophilum* evaluadas incrementaron entre un 122 y un 145% la Tasa de Extensión Lineal de las cepas de *Agaricus* spp. evaluadas. Este incremento estuvo en función del sustrato utilizado y de las cepas confrontadas.
- La pasteurización por ocho horas a 60°C ó con vapor por 1 hora a 90°C del sustrato (pasto pangola-2% de cal comercial- 10% de cal dolomítica y 70% de humedad), la posterior inoculación de *S. thermophilum* y la incubación del sustrato por 2-3 días a temperaturas menores a 48°C, permitió eliminar la fase I del composteo para cultivar *A. bisporus*. Obteniéndose una Eficiencia Biológica del 38%.
- Si en el proceso anterior se sustituye la incubación a 45°C por un composteo controlado de 48 horas, la Eficiencia Biológica obtenida se incrementa al 79%. Se recomienda seguir explorando durante el proceso de composteo reducido, ya que la cantidad y altura del sustrato condiciona los parámetros fisicoquímicos y con ello el establecimiento y colonización de *S. thermophilum*.
- La adición de suplementos no mostró una tendencia clara en cuanto al efecto de éstos sobre la producción de carpóforos. Se recomienda evaluar la aplicación de suplementos utilizando nutrientes de disponibilidad retrasada.

7. REFERENCIAS

- Bechara, M., Heinemann, P., Walker, P. y Romaine, C. 2005. Cultivation of *Agaricus bisporus* on a mixture of cereal grain spawn and delayed-release nutrient supplement. *In: Mush. News.* 53 (8): 6-10.
- Chang, S.T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* (Berk) Sing. in China. *Int. J. Med. Mush.* 1: 291-300.
- Dahlberg, K. R. 2004. Carbohydrate-Based Mushroom Supplements. *Mushr. News.* 52: 76-11.
- Duns, G.J., Rinker, D.L., King, L., Ripley, B.D. and Alm, G. 2004 Comparasions of odor emissions from mushroom substrate prepared by traditional windrow and forced aeration composting methods using organoleptic and analytical chemical methods of odor assessment. *Mush. News* 52(8):6-24.
- Fernández M., F. 1998. El champiñón, una opción de inversión. *In: Memorias del Primer Simposio Nacional de Hongos Comestibles.* (Pachuca, Hgo. SEP). INIFAP/UAEH. pp. 47-54.
- García, B.S., Royse, D.J. and Sanchez, J.E. 2005. Vermicompost in substrate and casing formulas for the production of brown *Agaricus bisporus*. *In: Proceedings of the fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* Eds. Tan, Q., Jingsong, Z., Mingjie, C., Hui, C. and Bus well, A. 551. pp 243-248.
- Gea A., F. J. 1995. Micosis del Cultivo de Champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) en Castilla La Mancha. Estudio de la verticiliosis (agente causal: *Verticillum fungicola* (Preuss) Hassebrauk). Universidad de Murcia. Facultad de Biología. 13-37.
- Guzmán, G, G. Mata, D. Salmenes, C. Soto-Velasco y L. Guzmán-Dávalos. 1993. *El cultivo de los hongos Comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales.* Instituto Politécnico Nacional, México

Harvey C. 1982. Some biological indicators of compost quality. *In: Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers Special publication*. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University, 129. pp 11-18.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. Dictionary on the fungi. International Mycological Institute. CAB International. Cambridge, UK.

Hernández, R., D., Sánchez, J.E. and Yamasaki, K. 2003. Composting a simple procedure substrate for cultivation *Pleurotus ostreatus*. *Biores. Technol.* 90 (2):145-150.

Kerrigan, R. W. 2005. *Agaricus subrufescens* a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycol.* 97(1): 12-24.

Lahman, O. and Rinker, D.L. 2004. Mushroom Practices and Production in Latin America. *In: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Romaine, C.P. Keil, C.B., Rinker, D.L. and Royse, D.J. The Pennsylvania State University, USA. 681-686

Lucier, G. y C. Plumier. 2003. Mushroom Outlook. *Mush. News*. (No. De revista pendiente): pp 6-11.

Mee, H.M. 1978. US Patent 4 127 964.

Murphy, W.S. 1972. Development of a Mushroom Production Medium without Phase I Composting. *Mush. News* 20(12): 4-22.

Op den Camp, H.J.M., Derkx, P.J.L., Van der Drift, C., Vogels, G.D. and Van Griensven, L.J.L.D. 1991. Odorous sulfur compounds emitted during conventional outdoor and during indoor composting. *Mush. Sci.* 13(1):147-153.

Op den Camp, H.J.M., Stumin, C. K., Straatsma, G., Derikx, P.J.L. and Van Griensven, L.J.L.D. 1990. Hyphal and micelial interaction between *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum* on agar media. *Microb. Ecol.* 19: 303-309.

Overtjins, A. 1998. The conventional Phase II in trays and shelves. *Mush. J.* 584: 15-21.

Pardo N., J. 1997. Compostaje para el cultivo de champiñón: una revisión de su ámbito de variabilidad y su repercusión en la calidad y costes del compost. *In: Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados*. Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES). Quintanar del Rey (Cuenca). 49-101.

Quimio, T.H. 2001. Preparación de semilla. 2001. *In: La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp.* Coedición El Colegio de la Frontera Sur/ Ed. Limusa, S.A. de C.V. México, DF. 290 pp. 141-156

Randle, P. E. 1983 Supplementation of mushroom compost- a review. *Crop. Res. (Hort. Res)*. 23: 51-69

Royse, D.J., Rhodes, T.W., Ohga, S. and Sánchez, J.E. 2004. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. *Biores. Technol.* 9:85-91.

Royse, D.J. and Sánchez, J.E. 2003. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO₃) on shiitake (*Lentinus edodes*) yield and mushroom size. *Biores. Technol.* 90: 225-228.

Royse, D.J., L.C. Schisler, and P.J. Wuest. 1982. Spawning to casing commercial mushroom production. *In: Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers Special publication*. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University, 129 pp. 43-48

Sánchez, J.E., Mejía, L, and Royse, D.J. 2006. Colonization of pangola grass with *Scytalidium thermophilum* for production of *Agaricus bisporus*. *Mush. Biol. and Mush. Prod.* UAEM.ISBM (In press)

Sánchez, J.E., Royse and D.J., Hernández, G. 2002. Desarrollo de Sustratos No Composteados para la producción de *Agaricus bisporus*. *Mush. Biol. and Mush. Prod.* UAEM.ISBM

Sánchez, J.E., and D.J. Royse. 2001a. Adapting substrate formulas used for shiitake for production of brown *Agaricus bisporus*. *Biores. Technol.* 1594: 1-5.

Sánchez, J.E., Royse, D.J. 2001b. *La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp.* Coedición El Colegio de la Frontera Sur/ Ed. Limusa, S.A. de C.V. México, DF. 290 p.

Satyanarayana, T., Johri, B.N. and Klein, J. 1992. Biotechnological potential of thermophilic fungi. *In: Handbook of applied Mycology.* New York, USA. 4: 731-759

Schisler, L.C. 1994. Nutrient Supplementation of Compost during the mushroom growth cycle. The Mushroom Growers Association. MGA. Boletín 179: 503-525.

Schisler, L.C. 1982. Biochemical and mycological aspects of mushroom composting. *In: Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers Special publication.* College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University, 129 pp.3-10

Schisler, L.C. 1982. Supplementation with vegetable oils before phase of composting. *In: Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers Special publication. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University.* 129 p. 41- 42.

Schisler, L.C. 1982. News innovations for efficient mushroom growing. *In: Wuest, P.J. Bengtson, G.D. (Eds), Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers.* Special publication. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University 129, pp.117-118.

Schisler, L.C. and Wuest, P. 1982. Selecting, manipulating and treating mushroom casing. *In: Wuest, P.J. Bengtson, G.D. (Eds), In: Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers.* Special publication. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University 129, 55-60.

Schisler, L.C. and Sinden, J.W. 1966. Nutrient supplementation of mushroom compost at casing vegetable oils. *Canadian journal of botany* 4: 287-293.

Sinden, J.W. and Schisler, L.C. 1962. Nutrient supplementation of mushroom compost at spawning. *Mush. Sci.* 5: 223-236.

Sinden, J.W. and Heuser, E. 1953. The nature of the short composting process and its relation to short composting. *Mush. Sci.* 2: 123-131.

Soto V, C. La importancia de la "semilla" o inóculo en la producción de hongos (I). . Boletín Revista Setas Cultivadas. Marzo 2004a. México, DF.

Stat Soft, Inc. (2004). STATISTICA (Data Analysis Software System), version 6. www.statsoft.com

Straastma, G. Samson, R.A., Olijnsma, T.W., Op den Camp, H.J.M., Gerrits, J.P.G. and Van Griesven L.J.L.D. 1994a. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and grown stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *App. Env. Microbiol* 60(2):454-458.

Straastma, G, Olijnsma, T.W., R.A., Olijnsma, T.W., Gerrits, J.P.G., Amsing, J.G.M., Op den Camp, H.J.M., and Van Griesven L.J.L.D. 1994b. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in button mushroom compost and its effect on yield. *App. Env. Microbiol.* 60 (9): 3049-3054.

Straastma, G., R.A. Samson. 1993. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. *Micol. Res.* 97 (3): 321-328.

Straastma, G., Gerrits, J.P.G., D. Van Griensven, L. J. L., Op den Camp, H., J., M. 1991. Growth of *Agaricus bisporus* mycelium on mushroom compost. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher(ed). Balkena, Rotterdam. 761-765

Straastma, G. R.A., Olijnsma, T.W., Op den Camp, H.J.M., Gerrits, J.P.G. and Van Griesven L.J.L.D. 1994., Augustijn, M.A.P.A.M., Op den Camp, H., J., M. Vogels, G.D., Van Griensven, L. J. L. 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiol* 135: 751-759.

Tansey, M. R., Jack, M.A. 1977. Growth of thermophilic and thermotolerant fungi in soil *in situ* and *in vitro*. *Mycol.* 69: 563-578.

Till O. 1962. Cultivation of mushroom on sterile substrate and reutilization of spent compost. *Mush.Sci.*5, 127-133.

Ulloa, M and Hanlin, R.T. 2002. *Illustrated dictionary of mycological*. The American Phytopathological Society. APS press. Minnesota, USA.

Vijay, B., Sharma, S.R. and Lakhanpal, T.N. 2002. Effects of treating post-compost supplements with different concentration of formaldehyde on the yield of *Agaricus bisporus*. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al. *Proceedings of the Fourth International Conference*. Cuernavaca, México239-242

Wasser, S.P., Didukh, M. Y., Amazonas, M., Nevo, E., Stamets, P. and F da Eira, A. 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murill. *International Journal of Medicinal Mushroom*, 4: 267-290.

Wiegant, W.M., Wery, J, Buitenhuis, E.T. and M. de Bont, J.A. 1992. Growth-Promoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *App. Env. Microbiol.* 58: 2654-2659.

Wiegant, W.M. 1992. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *App. Env. Microbiol.* 58: 1301-1307.

Wuest, P.J. 1977. Compost and Composting Process. *Mush. News* 26 (5):11-16.

Wuest, P.J., G.D. Bengston (Eds). 1982. *Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers Special publication*. College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University. 129 p.

APENDICE

A. Influencia de *S. thermophilum* sobre la velocidad de crecimiento micelial del género *Agaricus* spp. a nivel de laboratorio.

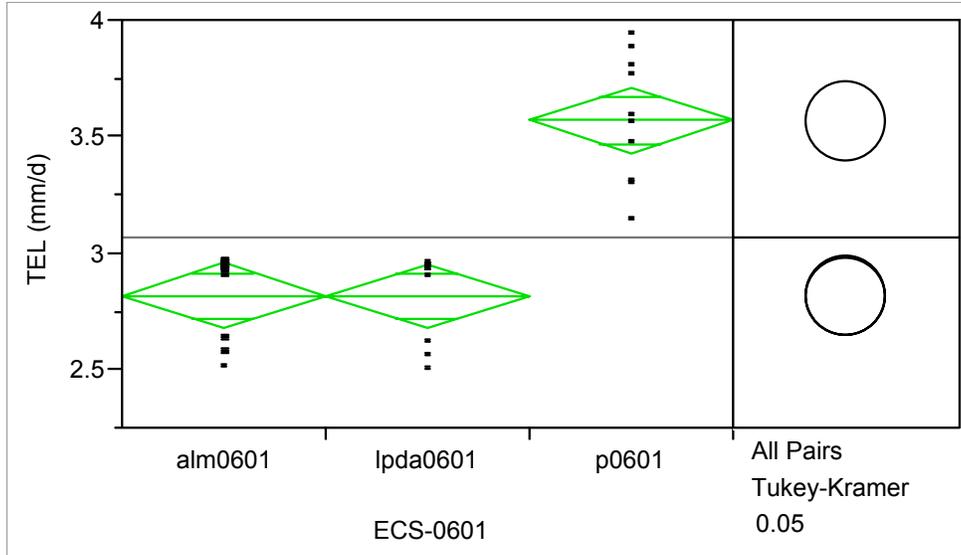


Tabla 1. TEL de *S. thermophilum* ECS 0601 en dos medios sintéticos y pasto pangola adicionado con el 2% de cal comercial.

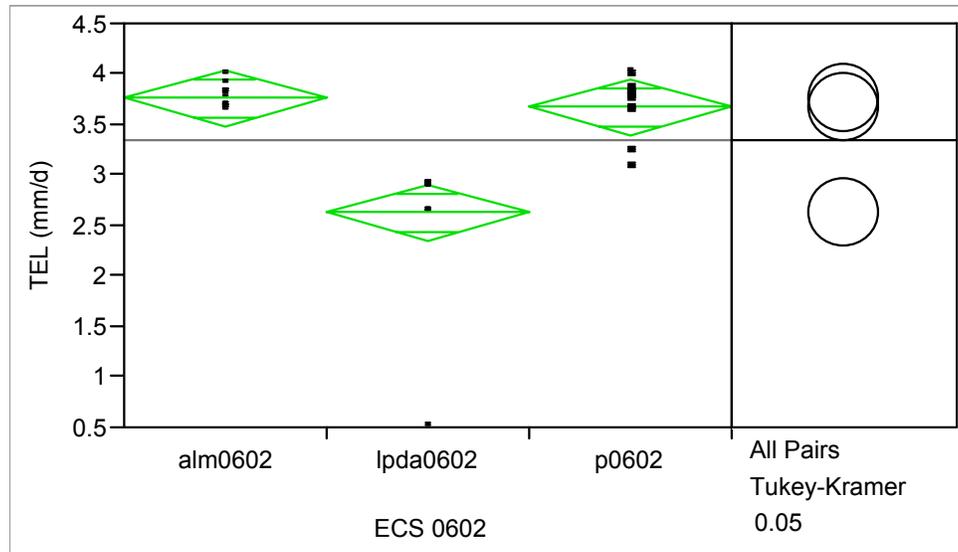


Tabla 2. TEL de *S. thermophilum* ECS 0602 en dos medios sintéticos y pasto pangola adicionado con el 2% de cal comercial.

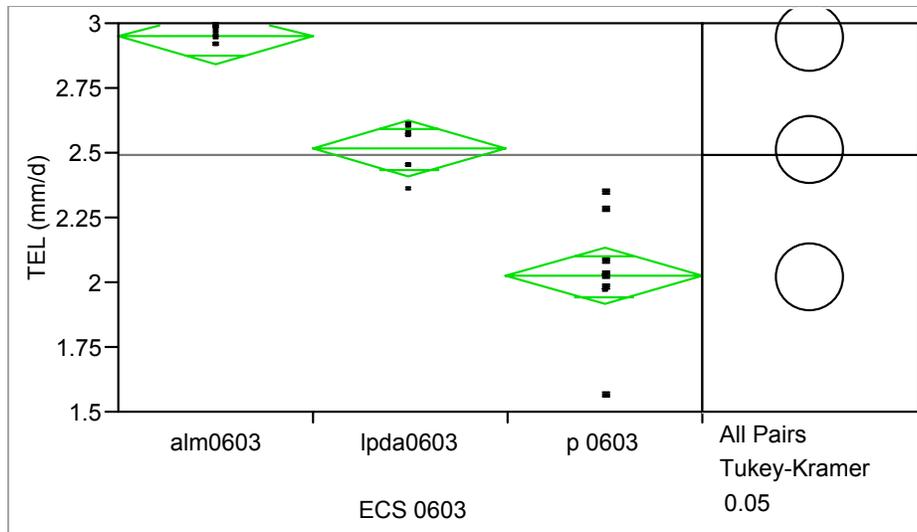


Tabla 3. TEL de *S. thermophilum* ECS 0603 en dos medios sintéticos y pasto pangola adicionado con el 2% de cal comercial

CEPAS	TEL (mm/d)	Desv Est
0305	0.14	0.03
0305/601	0.21	0.03
0305/602	0.18	0.03
0305/603	0.20	0.02
0302	0.14	0.03
0302/601	0.20	0.05
0302/602	0.22	0.04
0302/603	0.19	0.06
0316	0.09	0.02
0316/601	0.12	0.02
0316/602	0.11	0.02
0316/603	0.10	0.02

Tabla 4. Tasa Extensión Lineal de *Agaricus* spp. ECS 0305, 0302 y 0316 en pasto pangola con acción de tres cepas de *S. thermophilum*

Análisis de Varianza					
Fuente de Variación	S.C	g.l.	C.M.	Fc	Ft
<i>Agaricus</i> spp.	62.434	2	31.217	804.39	1.42318E-200
<i>S. thermophilum</i>	15.716	3	5.239	134.99	3.95499E-72
<i>Agaricus</i> spp. * <i>S. thermophilum</i>	3.047	6	0.508	13.09	3.12713E-14
Error	34.695	894	0.039		
Total	115.892	905			

Tabla 5. ANOVA de la interacción de *Agaricus* spp. ECS 0305, 0302 y 0316 en pasto pangola con acción de tres cepas de *S. thermophilum*.

<i>Agaricus spp.</i>	<i>S. thermophilum</i>	Medias transf	Comparación De medias	N
a305	Testigo	-1.96710	C	72
a305	c602	-1.73032	B	69
a305	c603	-1.61770	A	72
a305	c601	-1.55981	A	95
a302	Testigo	-1.96665	C	69
a302	c603	-1.73039	B	63
a302	c601	-1.62293	A	69
a302	c602	-1.54716	A	69
a316	Testigo	-2.40549	C	84
a316	c603	-2.31180	B	84
a316	c602	-2.24490	B	74
a316	c601	-2.10151	A	86
<i>S. thermophilum</i>	<i>Agaricus spp.</i>	transf Mean	Comparación de medias	N
Testigo	a316	-2.40549	B	84
Testigo	a305	-1.96710	A	72
Testigo	a302	-1.96665	A	71
c601	a316	-2.10151	B	86
c601	a302	-1.62293	A	68
c601	a305	-1.55981	A	95
c602	a316	-2.24490	C	74
c602	a305	-1.73032	B	69
c602	a302	-1.54716	A	69
c603	a316	-2.31180	C	83
c603	a302	-1.73039	B	63
c603	a305	-1.61770	A	72

Tabla 6. Comparación de medias de la interacción de *Agaricus spp.* ECS 0305, 0302 y 0316 en pasto pangola con acción de tres cepas de *S. thermophilum*

*Letras diferentes muestran diferencia significativa con un $\alpha=0.05$

B. Viabilidad técnica de un método de cultivo de *A. bisporus* sobre un sustrato no composteado colonizado por *S. thermophilum*

		d0	d1	d2	d3	d4	d5
ph	pHT1	7.88	8.21	8.64	8.59	8.58	8.60
	phT2	8.41	8.31	8.16	8.24	8.32	8.11
	stdMed T1	0.06	0.09	0.06	0.08	0.09	0.06
	stdmedT2	0.05	0.14	0.08	0.05	0.07	0.10
hum	HumT1	67.55	67.13	66.78	66.68	66.75	66.05
	HumT2	66.96	66.08	62.81	61.56	60.73	60.88
	stdMed T1	0.41	0.26	0.91	0.48	0.69	0.58
	stdmedT2	0.22	0.23	0.12	0.14	0.56	0.52
temp	TempT1	40.00	48.75	43.33	45.83	41.42	33.67
	TempT2	39.33	46.00	45.25	37.42	35.50	31.00
	std medt1	3.77	3.18	6.13	5.42	2.71	2.83
	stdmedt2	2.36	1.41	1.06	5.54	6.36	1.41

Tabla 7. Evolución de los factores físico químicos del sustrato pasto pangola adicionado con el 2% de cal y 10 % de cal dolomítica durante el composteo con la cepa *S. thermophilum* ECS-0601.

		do	d1	d2	d3	d4	d5
r1	1	0.142	0.142	0.164	0.253	0.211	0.241
	2	0.141	0.135	0.149	0.202	0.233	0.217
	3	0.149	0.171	0.226	0.202	0.241	0.182
	4	0.118	0.156	0.159	0.201	0.248	0.173
	5	0.099	0.167	0.215	0.197	0.172	0.159
	6	0.105	0.159	0.195	0.201	0.224	0.119
r2	7	0.058	0.133	0.110	0.170	0.083	0.010
	8	0.060	0.144	0.090	0.151	0.122	0.010
	9	0.073	0.043	0.079	0.010	0.053	0.010
	10	0.044	0.040	0.048	0.010	0.062	0.010
	11	0.010	0.037	0.010	0.010	0.117	0.010
	12	0.010	0.040	0.010	0.010	0.125	0.010
STD DEV		0.049	0.056	0.075	0.095	0.072	0.094
PROM		0.084	0.114	0.121	0.135	0.158	0.096

Tabla 8. Tasa de extensión lineal (TEL) de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	de Grados libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.04230971	5	0.00846194	1.475643	0.20969613	2.35380896
Dentro de los grupos	0.37847105	66	0.00573441			
Total	0.42078076	71				

Tabla 9. ANOVA de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

Comparación de medias usando la prueba de Tukey-Kramer HSD						
q*						
2.9351						
Abs(Dif)-LSD						
	5	4	3	2	6	1
5	-0.09072	-0.06788	-0.05438	-0.04705	-0.02905	-0.01722
4	-0.06788	-0.09072	-0.07722	-0.06988	-0.05188	-0.04005
3	-0.05438	-0.07722	-0.09072	-0.08338	-0.06538	-0.05355
2	-0.04705	-0.06988	-0.08338	-0.09072	-0.07272	-0.06088
6	-0.02905	-0.05188	-0.06538	-0.07272	-0.09072	-0.07888
1	-0.01722	-0.04005	-0.05355	-0.06088	-0.07888	-0.09072

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Tabla 10. Comparación de medias de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

	Rep	do	d1	d2	d3	d4	d5
r1	1	0.407	0.277	0.282	0.271	0.213	0.230
	2	0.400	0.276	0.296	0.265	0.209	0.239
	3	0.203	0.514	0.429	0.306	0.232	0.267
	4	0.217	0.516	0.391	0.334	0.239	0.246
	5	0.273	0.281	0.335	0.288	0.254	0.234
	6	0.265	0.264	0.346	0.299	0.246	0.228
r2	7	0.261	0.221	0.421	0.398	0.309	0.010
	8	0.177	0.208	0.419	0.396	0.329	0.010
	9	0.019	0.411	0.350	0.398	0.312	0.010
	10	0.017	0.410	0.352	0.398	0.234	0.010
	11	0.010	0.410	0.311	0.395	0.143	0.010
	12	0.010	0.409	0.294	0.396	0.183	0.010
Desv. estándar		0.146	0.108	0.052	0.056	0.054	0.121
PROM		0.185	0.331	0.329	0.323	0.227	0.125

Tabla 11. Tasa de extensión lineal (TEL) de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 40 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.56525944	5	0.113051888	12.0139518	2.7609E-08	2.35380896
Dentro de los grupos	0.6210633	66	0.00941005			
Total	1.18632274	71				

Tabla 12. Tasa de extensión lineal (TEL) de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 40 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

Comparación de medias usando la prueba de Tukey-Kramer HSD

q*

2.9351

Abs(Dif)-LSD

	3	2	1	4	0	5
3	-0.11597	-0.11597	-0.11356	-0.10914	0.047943	0.110859
2	-0.11597	-0.11597	-0.11356	-0.10914	0.047943	0.110859
1	-0.11356	-0.11356	-0.11597	-0.11156	0.045526	0.108443
4	-0.10914	-0.10914	-0.11156	-0.11597	0.041109	0.104026
0	0.047943	0.047943	0.045526	0.041109	-0.11597	-0.05306
5	0.110859	0.110859	0.108443	0.104026	-0.05306	-0.11597

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Comparación de medias usando "t" de Student

t

1.99656

Abs(Dif)-LSD

	3	2	1	4	0	5
3	-0.07889	-0.07889	-0.07647	-0.07206	0.085027	0.147944
2	-0.07889	-0.07889	-0.07647	-0.07206	0.085027	0.147944
1	-0.07647	-0.07647	-0.07889	-0.07447	0.08261	0.145527
4	-0.07206	-0.07206	-0.07447	-0.07889	0.078194	0.14111
0	0.085027	0.085027	0.08261	0.078194	-0.07889	-0.01597
5	0.147944	0.147944	0.145527	0.14111	-0.01597	-0.07889

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Tabla 13. Comparación de medias por el Método de Tukey y t Student's de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

REP1/60kg	Desv. Estándar	PROM
d0	3.08	7.57
d1	6.67	16.37
d2	7.43	15.76
d3	7.72	11.50
d4	6.22	20.36
d5	6.97	13.29

Tabla 14. Eficiencia biológica de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	840.120247	5	168.024049	2.21564837	0.0787432	2.53355455
Dentro de los grupos	2275.05481	30	75.8351605			
Total	3115.17506	35				

Tabla 15. ANOVA de la EB de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola s composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

Alpha=0.05

Comparación de medias usando "t" de Student

t
2.04227

Abs(Dif)- LSD	4	5	3	2	1	0
4	-10.2708	-7.2491	-5.5924	-4.1241	1.8709	3.3376
5	-7.2491	-10.2708	-8.6141	-7.1458	-1.1508	0.3159
3	-5.5924	-8.6141	-10.2708	-8.8024	-2.8074	-1.3408
2	-4.1241	-7.1458	-8.8024	-10.2708	-4.2758	-2.8091
1	1.8709	-1.1508	-2.8074	-4.2758	-10.2708	-8.8041
0	3.3376	0.3159	-1.3408	-2.8091	-8.8041	-10.2708

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Tabla 16. Comparación de medias de la EB de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 60 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

TRAT2	1	2	3	EB PROM	DESV ESTANDAR
d1	72.67	74.33	44.33	63.78	16.86
d2	79.57	76.80	82.33	79.57	2.77
d3	80.83	68.33	81.67	76.94	7.47
d4	59.00	43.00	72.00	58.00	14.53
d5	32.00	19.67	53.43	35.03	17.09

Tabla 17. Eficiencia biológica de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 40 Kg. de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

ANÁLISIS DE VARIANZA
TRAT2

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3828.23511	4	957.058778	5.62546549	0.01230133	3.47804969
Dentro de los grupos	1701.29704	10	170.129704			
Total	5529.53215	14				

Tabla 18. ANOVA de la EB de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 40 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

Alpha= 0.05

Comparación de medias usando "t" de Student
t 2.22814

Abs(Dif)-LSD	d2	d3	d1	d4	d5
d2	-23.7290	-21.1056	-7.9390	-2.1623	20.8044
d3	-21.1056	-23.7290	-10.5623	-4.7856	18.1810
d1	-7.9390	-10.5623	-23.7290	-17.9523	5.0144
d4	-2.1623	-4.7856	-17.9523	-23.7290	-0.7623
d5	20.8044	18.1810	5.0144	-0.7623	-23.7290

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Tabla 19. Comparación de medias de la EB de *A. bisporus* ECS 0305 sobre 40 kg de pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601.

C. Ensayo de valuación de cuatro suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus*.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	696.445783	3	232.148594	1.50647494	0.24340552	3.09839122
Dentro de los grupos	3082.0107	20	154.100535			
Total	3778.45649	23				

Tabla 20. ANOVA de la Evaluación de cuatro suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus* ECS 0305 sobre pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

D. Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus*

Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	
Model	5	391.27945	78.2559	4.0313	
Error	2	38.82435	19.4122		Prob > F
C. Total	7	430.1038			0.2106

Tabla 21. ANOVA de la Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus* ECS 0305 sobre pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

Alpha= 0.05

Comparación de medias usando "t" de Student

t

2.11991

Abs(Dif)-LSD

	7	4	5	8	6	1	2	3
7	-30.6966	-21.45	-20.1466	-17.7866	-17.457	-16.81	-6.81	-6.59
4	-21.45	-30.6966	-29.3933	-27.0333	-26.703	-26.0566	-16.0566	-15.8366
5	-20.1466	-29.3933	-30.6966	-28.3366	-28.007	-27.36	-17.36	-17.14
8	-17.7866	-27.0333	-28.3366	-30.6966	-30.367	-29.72	-19.72	-19.5
6	-17.4566	-26.7033	-28.0066	-30.3666	-30.697	-30.05	-20.05	-19.83
1	-16.81	-26.0566	-27.36	-29.72	-30.050	-30.6966	-20.6966	-20.4766
2	-6.81	-16.0566	-17.36	-19.72	-20.050	-20.6966	-30.6966	-30.4766
3	-6.59	-15.8366	-17.14	-19.5	-19.830	-20.4766	-30.4766	-30.6966

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Tabla 22. Comparación de medias de la Evaluación de tres suplementos proteicos sobre el rendimiento de *A. bisporus* ECS 0305 sobre pasto pangola composteado por *S. thermophilum* ECS 0601

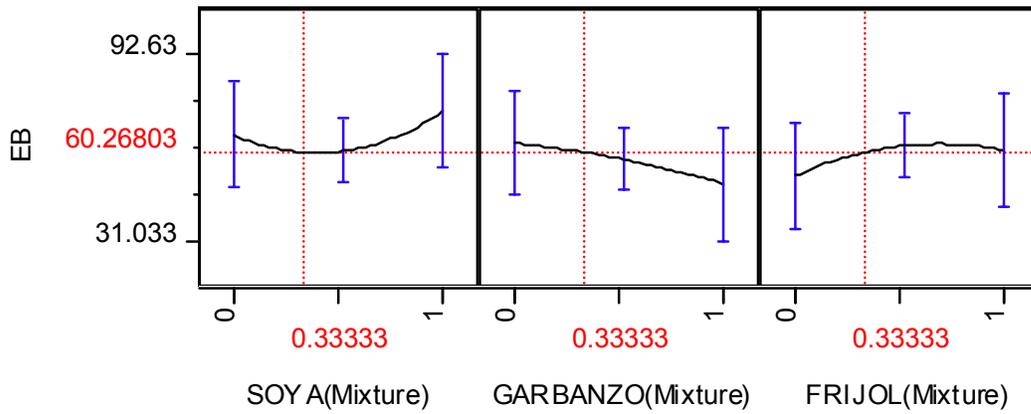


Fig. 11. Influencia de tres suplementos proteicos en la EB de *A. bisporus* ECS - 0305 sobre pasto pangola con el 2% de cal comercial y 10% de cal dolomítica composteado por *S. thermophilum* ECS-0601.