



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE MICROORGANISMOS
“SIXTO DAVID ROJO”**

**Producción de inóculos líquidos del hongo *Pleurotus ostreatus*
utilizando como sustrato *Cajanus cajan* (frijol quinchoncho)**

www.bdigital.ula.ve

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Autor: Daniel Josué Pérez Altuve
Tutor: MSc. Balmore Guerrero**

Mérida, 2019

AGRADECIMENTOS

Primeramente, a Dios Todopoderoso, por iluminar mi camino, por brindarme salud, sabiduría y fortaleza para lograr esta meta.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis, MSc. Balmore Guerrero, por su dedicación, asesoramiento, paciencia y amistad, durante el desarrollo del trabajo especial de grado.

Al Prof. Eduardo Chalbaud, por sus sugerencias y colaboración en el uso de la herramienta estadística de computación.

A los miembros del jurado, los profesores Rubén Gómez, Zarack Chacón y Pablo García, por sus correcciones y recomendaciones de interés, en la revisión del trabajo especial de grado.

A la Universidad de los Andes, de Mérida Venezuela, por abrirme las puertas de su casa, mi segundo hogar, de allí aprendí de excelentes profesores y compartí momentos agradables con grandes amistades.

DEDICATORIA

A Mi querida mamá María S. Pérez Altuve

Por todo su apoyo, entrega, amor incondicional, comprensión y motivación, las cuales fueron claves para cumplir esta meta. Por tus consejos y enseñanzas de superación, que me han ayudado hacer cada día mejor, como persona y profesional. ¡Este triunfo también es tuyo!

A toda mi familia Pérez Altuve

Mis abuelos (QEPD), tías, tío, primos, por apoyarme en todos mis sueños y por brindarme tanto cariño.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	3
DEDICATORIA	4
ÍNDICE.....	5
RESUMEN	7
CAPITULO I	8
MARCO TEÓRICO	8
1.1. Características generales de los hongos	8
1.2. Clasificación taxonómica de los hongos.....	8
1.3. Ciclo de vida de los Basidiomycota.....	9
1.4. Etapas del cultivo.....	10
1.5. Condiciones del Medio de Cultivo	12
1.6. Propiedades de Cajanus cajan (frijol quinchoncho).....	14
CAPITULO II	15
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	15
CAPITULO III	18
EL PROBLEMA.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS.....	21
CAPITULO IV.....	23
MATERIALES Y METODOS	23
MATERIALES	23
Microorganismo	23
Medios de Cultivo	23
MÉTODOS.....	24
4.1. Preparación de los medios no convencionales	24
4.2. Preparación de los medios convencionales	24

4.3. Preparación de inóculos.....	24
4.4. Efecto de la concentración del extracto obtenido de frijol quinchoncho sobre la producción de biomasa del hongo <i>P. ostreatus</i>	25
4.5. Cinética de crecimiento de la cepa de <i>P. ostreatus</i> BIOMI 104 en medios líquidos a base de extracto de quinchoncho.	26
4.6. Comportamiento como inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.....	26
4.7. Tratamiento estadístico de los resultados	27
4.8. Método de evaluación de las variables	27
CAPITULO V.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CAPITULO VI.....	45
CONCLUSIÓN	45
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	53

RESUMEN

Se estudia el crecimiento y producción de biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* de la cepa BIOMI 104, cultivado en medios líquidos utilizando como sustrato *Cajanus cajan* (frijol quinchoncho). En la presente investigación se evaluó la producción de biomasa del hongo, cultivado a diferentes concentraciones de quinchoncho y medio PD (control), se obtuvo una mayor producción de biomasa, en medio PD ($7,86 \pm 0,01$ g/L) y el medio líquido de quinchoncho a 20 g/L ($7,62 \pm 0,41$ g/L). Luego se determinó la cinética de crecimiento del hongo, el cual dio una tasa de crecimiento en PD 4,08 y HQ 1,93 mg/día. Finalmente, durante el proceso de fructificación, el hongo *P. ostreatus* se cultivó en sustrato de tuza de maíz molida. De acuerdo a los resultados la EB fue mayor en medio PD (15 g/L) con un valor de ($21,73 \pm 2,59$), que en el medio de quinchoncho (20 g/L), que sólo obtuvo ($19,82 \pm 2,27$) %. En cuanto a la TP, en medio PD (15g/L), presentó un intervalo entre 0,48 a 0,92 EB/días, lo cual es mayor al inóculo de quinchoncho (20g/L), de 0,41 a 0,70 EB/días. El R en medio quinchoncho (20 g/L) fue de 4%, siendo mayor al 2% en medio PD. En el caso de la P del hongo, se determinó un mayor valor en medio de quinchoncho (20 g/L) con un rango de 0,082 a 0,140 % R /días, en comparación al medio PD (15 g/L) con un valor de 0,048 a 0,100 % R/días. Por tanto, según el análisis estadístico de ANOVA de una vía, no presentó diferencias significativas en las variables estudiadas a excepción de la variable R. En conclusión, el sustrato de quinchoncho es un excelente candidato para el cultivo a nivel industrial del hongo *P. ostreatus*, ya que provee una importante fuente de proteínas, que propicia el crecimiento de carpóforos de buena calidad. No obstante, hay que tomar en cuenta la pequeña proporción de factores antinutritivos que afectan la disponibilidad de nutrientes, lo cuales se logran desaparecer significativamente al someterse a tratamientos tecnológicos, especialmente térmicos.

PALABRAS CLAVE: *Cajanus cajan*, inóculo líquido, *Pleurotus ostreatus* y producción de biomasa.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Características generales de los hongos

Son organismos eucariotas con un núcleo bien definido y una membrana organizada, son aerobios, heterótrofos (quimioorganótrofos). Tienen una pared celular formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina. Consta de un talo o micelio que está formado por muchos filamentos o hifas. Los hongos se dividen en microscópicos y macroscópicos. En cuanto a los macroscópicos el micelio tiene una apariencia algodonosa y blanquecina formando el cuerpo de reproducción. Dentro de los hongos macroscópicos se encuentran los *Ascomycota* y *Basidiomycota* presentando una reproducción sexual y asexual (Stemets, 2003; Arenas, 2008; Koneman, Winn, Allen, Janda. Procop, Schreckenberger y Woods, 2008; Bonitaz, 2012).

1.2. Clasificación taxonómica de los hongos

Los Basidiomycota

Son también llamados hongos superiores. La estructura característica es el basidio, implicado en la reproducción sexual. El basidio se produce en el extremo de hifas dentro de una estructura llamada basidiocarpo, cada basidio genera de dos a 4 esporas. La mayoría de estos hongos descomponen restos vegetales, en especial la celulosa y lignina (Prescott, Harley y Klein, 2002).

Orden Agaricales. Son hongos que poseen esporas de color café, presentando diferentes anillos a partir de un velo parcial y laminillas. Éste orden está integrado por especies de hongos comestibles. Son de gran importancia económica para el hombre, ya que son usados como alimento, medicina, descomponedores en la agricultura y en la industria (Solomon, Berg, Martin y Villee, 1996).

Según Solomon *et al.*, (1996) el orden *Agaricales* está formado por las siguientes partes:

- Cutícula: es la membrana más extraña que cubre el píleo y el pie, indispensable para conocer la especie, ya sea por su estructura o el color.
- Píleo: es la parte más ancha del hongo, situado en el pie, presentando una diversidad de colores con forma de paragua.
- Himenóforo: es la parte inferior del píleo, sosteniendo el himenio que es donde se encuentran las basidiosporas.
- Pie: sostiene el píleo, pudiendo ser rectos o curvos.
- Anillo: se encuentra debajo del píleo cuando está expandido, funcionando como protector del himenio y así facilitando la maduración de las basidiosporas.
- Volva: es la parte que está en contacto con la tierra, de característica membranosa.

1.3. Ciclo de vida de los Basidiomycota

Empieza con la germinación de una basidiospora para producir un micelio monocarionte (micelio primario) creciendo rápidamente y expandiéndose en el suelo. Cuando el micelio primario encuentra otro micelio monocarionte sexualmente compatible, ambos se fusionan para formar el micelio secundario

dicarionte, éste es estimulado para así producir el basidiocarpo. Muchas hifas forman un botón, que luego se alarga y forma un sombrero. El sombrero o carpóforo posee muchas laminillas, cada una está revestida de basidios. Dos núcleos de la punta de cada basidio se fusionan y forman un núcleo de cigoto diploide, que seguidamente realiza una meiosis formando 4 núcleos haploides. Estos núcleos evolucionan hasta formar las basidiospora, que son liberadas cuando están maduras (Prescott *et al.*, 2002).

El Hongo P. ostreatus

Es un hongo saprofita, descomponedor, que crece en árboles. la palabra *Pleurotus* proviene del griego “Pleuro” que significa lateralmente o en posición lateral, haciendo referencia a la posición del estípite con respecto al píleo, y la palabra *ostreatus* viene del latín que significa “ostra”, haciendo referencia a la apariencia del cuerpo fructífero. *P. ostreatus* posee importantes propiedades, las que se destacan: propiedades alimenticias y medicinales. En cuanto a las propiedades alimenticias se encuentran el alto contenido de proteínas, presencia de aminoácidos esenciales, alto contenido de minerales, y así como un bajo contenido calórico y de carbohidratos. Y las propiedades medicinales destacan el retardo en el crecimiento de los tumores (Miles y Chang, 1997; Romero *et al.*, 2000; Stamets, 2000).

1.4. Etapas del cultivo

Obtención de la cepa. El hongo se obtiene a partir de cultivos puros que se mantienen conservados en agar, luego de estos cultivos se transfiere el micelio a tubos de ensayos que contienen agares nutritivos, y de allí a cajas de Petri con medios agarizados para propagar el micelio (Rodríguez y Gómez, 2001).

Obtención del micelio. Se debe tener presente el mantenimiento de la cepa y la producción del inóculo. En cuanto al mantenimiento, esta consiste en la conservación en condiciones óptimas del material genético proveniente de clones silvestre, híbrido, cepas comerciales, o cualquier otro material valioso usando una metodología confiable, sencilla asegurando no sólo la conservación de las características genéticas de las cepas, sino también su vitalidad. Para la producción de inóculo se utiliza el término de semilla del hongo, el cual es el micelio del hongo utilizado para inocular un sustrato dado. Hay dos tipos de semillas: semilla madre o primaria y la semilla secundaria o semilla para la siembra. La semilla primaria proviene directamente del micelio del hongo cultivado sobre un medio a base de agar usando botellas como recipientes. Frecuentemente, el sustrato utilizado para preparar la semilla primaria son granos de cereales, estos granos son trigo, centeno, mijo, sorgo, arroz. Mientras las semillas secundarias se usan desechos sólidos como sustratos y el tipo de recipiente son bolsas plásticas termo resistentes (Sánchez y Royse, 2001).

Preparación del sustrato. Tanto el micelio como los cuerpos fructíferos pueden desarrollarse sobre residuos lignocelulósicos. El sustrato debe tener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo, entre ellos debe estar la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, que funcionan como fuentes principales de carbono y nitrógeno. Comúnmente los materiales más utilizados son la paja de trigo, avena, centeno, sorgo, y algodón, subproductos del algodón, tallos de plantas de maíz, así como desechos sólidos (Donoso, 1999; Stemets, 2003; Chang y Miles, 2004).

Incubación. Durante este período el hongo coloniza el sustrato de preferencia, a temperatura y humedad óptima, y en oscuridad. Durante esta etapa, se debe proporcionar al hongo una temperatura constante y acorde con sus requerimientos (Oei, 2003; Fernández, 2004).

Fructificación. Comienza una vez que el sustrato es invadido por el micelio del hongo y se logran observar primordios, los cuales formarán el cuerpo fructífero. Para esta fase es necesario cambiar las condiciones del cultivo aumentando la humedad relativa y las condiciones de luminosidad para introducir la formación de los hongos (Oei, 2003; Fernández, 2004).

Cosecha. En la cual se realiza la recolección de los cuerpos fructíferos en forma manual, haciendo un movimiento de torsión sobre la base del estipe o utilizando una cuchilla estéril para evitar contaminaciones posteriores en los puntos del sustrato donde creció el hongo. Así mismo, la cosecha se divide en tres períodos, el primer período en el cual se recoge el 50% de la producción, el segundo en donde se recoge el 30% y el tercer período solamente el 20% de la producción. Habitualmente, en el cultivo de hongos no se recoge más de tres cosechas, ya que la productividad es muy baja y el riesgo de contaminación es más frecuente (Oei, 2003; Fernández, 2004).

1.5. Condiciones del Medio de Cultivo

Requieren una mezcla equilibrada de fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, y factores de crecimiento, que en condiciones bioquímicas y físicas adecuadas permiten el buen crecimiento de los microorganismos (Meynell y Meynell, 1970). Entre los factores que más influyen sobre el crecimiento del hongo tenemos:

- a) **La temperatura:** Influye tanto en la capacidad enzimática del organismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. *P. ostreatus*, durante la formación del micelio, crece a temperaturas óptimas de 26-28° C y para fructificación en un rango de temperatura de 12 a 18°C (Ardón, 2007).

b) El potencial de hidrógeno (pH): Tiene una influencia directa sobre el hongo, porque influye directamente sobre las proteínas de la membrana. Para el crecimiento de *Pleurotus* se han citado rangos de crecimiento entre 4 y 7 de pH, con un óptimo entre 5 y 7. Dado a que este rango de pH la mayoría de los contaminantes que se encuentran durante el proceso de cultivo son más sensibles (Ardón, 2007).

c) Relación C/N: El carbono es necesario para los hongos porque es la fuente directa de energía para su metabolismo; así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Como complemento, el nitrógeno, propicia un rápido crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos. Como ya se mencionó, el carbono y el nitrógeno son dos elementos esenciales en la nutrición de cualquier organismo, se ha determinado que la relación óptima para el crecimiento en medio líquido de *P. ostreatus* es de 40:1 (Ardón, 2007).

d) La humedad en el sustrato: El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo del hongo ostra porque afecta la disponibilidad de nutrientes. Así, los contenidos de humedad inferiores al 50% no serán propicios y una humedad superior al 80% tendrá un efecto negativo en el crecimiento por la escasez de oxígeno. Cada sustrato tiene una capacidad de retención de agua diferente, pero lo ideal en el cultivo es que posea alta capacidad de almacenamiento y de retención de humedad (Ardón, 2007).

e) La humedad del aire: Este es un factor de suma importancia para la adecuada fructificación de *P. ostreatus*. Dado que los cuerpos fructíferos están formados por un alto contenido de agua y su estructura hifal no les permite retener la humedad en condiciones adversas, un balance adecuado entre la humedad ambiental y el contenido de humedad del hongo es

necesario. Debido a esto, la humedad relativa del ambiente donde crece el hongo debe oscilar entre 50 a 55%, suficiente para evitar que tanto el sustrato como los cuerpos fructíferos se deshidraten (Ardón, 2007).

- f) Ventilación e iluminación:** El oxígeno es un factor determinante para el crecimiento de los basidiomicetos porque son organismos aerobios, que requieren del elemento para llevar a cabo ciertos procesos biológicos y también es necesario para degradar algunos nutrientes contenidos en el sustrato. Con respecto al factor iluminación, *P. ostreatus* requiere ser expuesto a longitudes de onda inferiores a 600 nm, sin embargo la sensibilidad tanto de la cantidad como de la calidad de la luz depende de la cepa (Ardón, 2007).

1.6. Propiedades de *Cajanus cajan* (frijol quinchoncho)

El quinchoncho (*Cajanus Caja*), es una planta leguminosa, que produce abundantes semillas de color verde oscuro o verde jaspeado de púrpura durante el llenado de las vainas y de color crema o crema jaspeado a la maduración, estas semillas tiene en promedio 7 mm de longitud por 6 mm de ancho (Bosques, 2012). El quinchoncho ocupa un importante lugar en la dieta de los humanos, ya que tiene baja concentración de grasa, moderada cantidad de fibra, buena cantidad de proteína, almidones, un razonable balance de los minerales esenciales de toda dieta, es también una fuente rica en carbohidratos, minerales, vitaminas, ácidos grasos esenciales y componentes de vitamina E (tocoferoles y trazas de tocotrienoles) (Navarro y colaboradores, 2014). Por otro la lado, la planta es un arbusto anual o perenne, formado por un resistente tallo, de forma cilíndrica con un diámetro basal entre uno y cuatro centímetros, de coloración verde a verde púrpura, en donde se encuentran ramificaciones primarias, secundarias y terciarias.

CAPITULO II

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Según Morillo, Guerrero, Toro, Tovar, Castañeda, García y Torres, (2013). Realizaron cultivos del hongo sobre bloques de sustratos elaborados con tusa de maíz, hoja de caña, mezcla de ambos, tusa de maíz con cal y hoja de caña con cal, desarrollando 5 réplicas para un total de 25 bloques de sustrato, aportando un 68% de humedad en bolsas de polietileno. La inoculación se realizó por inyección de un homogenizado del micelio proveniente de un cultivo líquido. Los cuerpos fructíferos fueron pesados y relacionados con el peso seco del sustrato para la estimación de la eficiencia biológica. Mediante pruebas estadísticas de ANOVA y la prueba de comparación de Tukey encontraron diferencias significativas entre los sustratos empleados. El sustrato con hoja de caña obtuvo una eficiencia biológica de $53,10 \pm 2,70\%$, el sustrato de hoja de caña con cal $35,88 \pm 6,02\%$, tusa de maíz $23,25 \pm 3,107\%$, tusa de maíz con cal $32,10 \pm 1,06\%$ y la mezcla de hoja de caña-tusa de maíz $23,90 \pm 6,02\%$, llegando a la conclusión que la hoja de caña tiene un potencial como sustrato para el cultivo de hongos. Este reporte es de gran importancia para nuestro estudio pues demuestra que la utilización de inóculos líquidos directamente sobre el sustrato de producción se logra obtener buenos resultados.

Chegwin y Nieto (2013), en su estudio evaluaron el efecto que tiene el empleo de harinas de cereales como fuente de carbono en la fermentación en estado líquido de *P. ostreatus*, utilizando matraces con medios de cultivos suplementado con la harinas de: cebada, avena, trigo, arroz, bienestarina (harinas de cereales y leguminosas), maíz, soya, salvado de trigo, trigo integral, maíz pinto, harina de siete granos y maíz amarillo, la incubación se realizó a 26°C en oscuridad durante 15 días. En un análisis comparativo de la composición porcentual de los extractos, proceso fermentativo y de las harinas de cereales con los medios agotados se concluyó que no hay un comportamiento generalizado entre la relación Carbono/Nitrógeno del cereal y la producción de los compuestos del producto biotecnológico y con respecto a la producción de metabolitos secundarios, las fuentes de carbono ideales serían bienestarina, harina de cebada, de avena, maíz y maíz pinto. En este trabajo se pone en evidencia el efecto de la composición del medio sobre el metabolismo del hongo y se reafirma que el hongo puede aprovechar diferentes fuentes de nutrientes, desde el punto de vista metodológico resulta de gran importancia por los métodos y técnicas utilizadas en la preparación de medios, y análisis de los resultados.

En una investigación más reciente, Arana, Burrola, Garibay y Franco, (2014) cuyo objetivo fue: aislaron vegetativamente en diferentes medios de cultivo cepas de algunas especies de hongos usadas como alimento; igualmente estudiaron las características de las cepas e identificaron el medio más adecuado para el cultivo *in vitro* y producción de inóculo primario en relación con la velocidad de crecimiento y producción de biomasa. De acuerdo a los autores, se obtuvieron cepas de *Psathyrellaspadicea*, *Floccularia* aff. *luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum* aff. *shimeji* las cuales se estudiaron *in vitro* en seis medios de cultivo: Agar croquetas de Perro, Agar Maíz, Agar Papa Dextrosa-Peptona y levadura, Agar extracto de Malta-Peptona y Levadura. *Flammulina mexicana* presentó mayor crecimiento y producción de biomasa en Agar croquetas de Perro. La cepa de *L. aff. shimeji* registró mayor velocidad de crecimiento en

Agar Papa Dextrosa-Peptona y Levadura, y mayor producción de biomasa en Agar de Extracto de Malta-Peptona y Levadura, ambas cepas se incubaron a 18°C. Se produjo inóculo primario de *F. mexicana* y *L. aff. shimeji* en trigo y sorgo, obteniendo mayor densidad del micelio y porcentaje de grano cubierto con el sustrato de trigo. Al igual que en el caso anterior, en este trabajo se evidencia el efecto de la composición del medio sobre el comportamiento del microorganismo y que cada especie se comporta de forma particular ante los estímulos químicos y físicos a la que es sometida aportando suficientes bases teóricas que indican la necesidad de investigar cada cepa y su relación particular tanto con los medios de cultivo como con las condiciones fisicoquímicas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

P. ostreatus es un hongo saprófito que crece de forma natural en materiales constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en estado de descomposición, tales como troncos, desechos agrícolas o agroindustriales; bajo condiciones ambientales apropiadas, ésta especie de hongos aprovechan estos materiales y los degradan para obtener la energía y nutrientes necesaria para su desarrollo (Zadrazil, 1974; Stamets, 2000; Sánchez y Royse, 2001; Monterroso, 2007).

Ahora bien, el hongo *P. ostreatus* ha adquirido importancia a nivel nutricional ya que posee el doble de contenidos de proteínas que la mayoría de los vegetales, aproximadamente 21% de contenido de proteínas, y si se consumen como alimento adicional a la dieta tradicional de las zonas rurales basada en maíz y frijol, se logra un efecto complementario considerable en aminoácidos esenciales, sobre todo en lo que respecta al triptófano, treonina, lisina y metionina. Además de proteínas, *P. ostreatus* es rico en vitaminas del complejo B como la Tiamina (B1), Riboflavina (B2), niacina y ácido fólico, necesarias para el desarrollo del hombre, así como altas cantidades de minerales, vitamina C y D, ácidos grasos insaturados y un bajo contenido calórico (Martínez y Larqué, 1990; Romero, Rodríguez y Pérez, 2000; Martínez, Macías, Sánchez y Martínez, 2002). Aparte de las bondades nutricionales de *P. ostreatus*, también se han investigado sus propiedades medicinales destacando los efectos antitumorales atribuidos a compuestos químicos principalmente polisacáridos, en especial el glucano (Zbigniew y Whistler, 1987).

El cultivo de *P. ostreatus* se realiza en varias etapas, las cuales son: propagación del micelio, obtención de inóculos, preparación del sustrato de producción, inoculación del sustrato, incubación, fructificación y la recolección o cosecha. La obtención del micelio se inicia con la recolección en el campo de carpóforos frescos o comprando una cepa comercial, en el primer caso, esto debe ser realizado por expertos y luego de varios pasos de aislamiento y purificación se obtienen cultivos puros (cepas) que se utilizan en la generación de inóculos. El inóculo es el insumo fundamental en el cultivo de *Pleurotus*, a nivel de los fungicultores se conoce como semilla, debido a que es común la presentación en forma de semillas de cereales portadoras de micelio del hongo, y que se utilizan para inocular los sustratos lignocelulósicos utilizado en la producción comercial de los carpóforos del hongo (Sánchez y Royse, 2001).

Hay dos formas en que se puede preparar los inóculos, en la primera que denominaremos clásica, los inóculos se preparan partiendo de cultivos del hongo crecidos en placas de Petri o botellas conteniendo medios convencionales como el Agar Papa Dextrosa o Agar Malta, a partir de estos cultivos se toman trozos para inocular granos de cereales, como trigo, centeno, mijo, sorgo y arroz que previamente han sido hidratados, esterilizados y empacados en recipientes de plástico u otro material apropiado; estos cultivos son incubados en la oscuridad a 26°C durante 8 a 15 días, tiempo en el que el hongo ha invadido completamente las semillas, en este estado se conoce como blanco o semilla y puede ser utilizado para inocular los sustratos de producción (Sánchez y Royse, 2001).

Más recientemente se ha ensayado la producción de inóculos en forma líquida, en este caso también se parte de cultivos en medios agarizados pero en lugar de hacer la propagación en semillas de cereales, la propagación se realiza en Erlenmeyer conteniendo medios líquidos compuestos por sustratos solubles o suspendidos, los cuales se incuban con agitación en oscuridad a 26°C. Este método permite la producción de grandes cantidades de inóculo de alta calidad en

períodos muy cortos de tiempo y pueden ser utilizados directamente como inóculo en la producción de carpóforos o en la elaboración de grandes cantidades de inóculos sólidos en forma de semilla (Aguilar, 2007).

Por consiguiente, se propone como alternativa a la producción de inóculos en semillas, la producción de inóculos en medios líquidos, ya que permite producir mayor cantidad de biomasa y de mejor calidad en menor tiempo, reduciendo en un 20% el tiempo de producción de inóculo, comparado con el medio de cultivo en semillas, favoreciendo la adaptación y dispersión del hongo en el sustrato, y facilitando su manipulación durante la siembra, también se debe tener en cuenta que actualmente en Venezuela es difícil y costosos adquirir semillas de cereales y los medios convencionales para el cultivo de microorganismos, es allí donde se orienta la investigación en la siguiente interrogante ¿Es posible la producción de inóculos líquidos del hongo comestible *P. ostreatus* en medios no convencionales?

También se debe tener en cuenta que en nuestro país la industria de producción de hongos comestibles se limita a pequeños productores de champiñones y en muy baja escala a otros hongos como el *Pleurotus*. El análisis del problema nos conduce a dos causas posibles, la primera es la falta de tradición de cultivo y al escaso conocimiento sobre el mismo, la segunda estaría orientada a la no existencia en el país de los insumos necesarios para el cultivo, entre ellos destaca la falta de laboratorios de producción de inóculos, por otra parte hay que tener en cuenta que los costos de los inóculos importados hace casi imposible su adquisición por lo que es de suma importancia para iniciar el proceso del cultivo en el país.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En Venezuela es casi inexistente el cultivo de hongos comestibles, esto debido principalmente a la falta de centros de producción de inóculos en el país y los productores tienen que acudir a la importación de los mismos, siendo está imposible, por lo que es necesario buscar alternativas para estandarizar el proceso de producción del inóculos. La producción de inóculos nacionales debe estar basada en consideraciones económicas de disminución de costos sin desmejoras en la calidad, para ello es necesario utilizar como medios de cultivo materia prima nacional, con tratamientos apropiados que permitan la producción masiva de inóculos de calidad. Es por ello que el conocimiento de la problemática y el estudio de ésta, darán pie a otras investigaciones e incógnitas sobre cómo realizar una producción de inóculos de hongos comestibles a un bajo costo en el país. La justificación metodológica de este proyecto está representada por la implementación de las técnicas y teorías necesarias para obtener inóculos líquidos del hongo comestible *P. ostreatus* aplicando medios no convencionales. Por último el proyecto tiene una justificación práctica, ya que los resultados que se obtendrán podrían contribuir a fomentar el cultivo a nivel nacional de este hongo.

HIPÓTESIS

P. ostreatus puede crecer en cultivos líquidos sobre una gran variedad de sustratos, principalmente en los convencionales de laboratorio y la producción de biomasa depende de la concentración de los componentes del medio de cultivo. Conociendo que frijol quinchoncho es rico en nutrientes es posible que extractos solubles obtenidos a partir del mismo se puedan utilizar en el cultivo del hongo en medios líquidos y que variaciones en la concentración de los extractos produzcan variaciones en la producción de biomasa del hongo.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la producción de inóculos líquidos del hongo comestible *P. ostreatus* utilizando como sustrato harina de frijol quinchoncho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la concentración del extracto obtenido de frijol quinchoncho sobre la producción de biomasa del hongo *P. ostreatus*.
- Determinar la cinética de crecimiento del hongo en medios líquidos a base de extracto de quinchoncho.
- Estudiar el comportamiento como inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos Sixto David Rojo, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

MATERIALES

Microorganismo

La cepa de *P. ostreatus* BIOMI 104 perteneciente al cerapio del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos Sixto David Rojo de la Universidad de Los Andes, se mantuvo refrigerada en cuñas de agar Papa Dextrosa y se repicó cada 3 meses en el mismo medio.

Medios de Cultivo

Medios no convencionales. Frijol quinchoncho fué adquirido en el mercado local y se trasladó inmediatamente al laboratorio, posteriormente se colocó en una estufa a 80°C hasta alcanzar una humedad de 10% y se pulverizó a un tamaño de partícula $\leq 0,5\text{ml}$ utilizando un molino de martillos, a continuación la harina de frijol se guardó en bolsas plásticas herméticamente selladas hasta su uso en la preparación de los medios de cultivo como se especificará más adelante.

Medios convencionales. Medio Papa Dextrosa Agar Himedia®.

MÉTODOS

4.1. Preparación de los medios no convencionales

La harina de quinchoncho se resuspendió en agua destilada a concentración final de (15, 20, 25 y 30 g/L) sometiendo a ebullición durante 10 minutos cada concentración por separado, luego se ajustó el volumen inicial con agua destilada, inmediatamente se filtró a través de un filtro de tela (tipo coladora de Café), recuperándose el filtrado (extracto de quinchoncho). Posteriormente, se agregó 25mL del medio líquido de quinchoncho en 3 Erlenmeyer de 125mL para cada concentración y se esterilizó en la autoclave a 120°C durante 30 minutos, dejándose enfriar y finalmente se inoculó como se indica más adelante (en lo sucesivo a este medio se le denominara medio de quinchoncho).

4.2. Preparación de los medios convencionales

El medio agar papa dextrosa (PDA) se preparó según las instrucciones del fabricante, distribuyendo 150 mL del medio en Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizó como se indicó anteriormente (en lo sucesivo a este medio se le denominara como medio PDA).

4.3. Preparación de inóculos

A partir de un cultivo de la cepa de *P. ostreatus* BIOMI 104 en cuña, se tomó una alícuota con asa y se inoculó en el centro de placas de Petri que contenían medio agar Papa Dextrosa, posteriormente se incubó a 27°C en oscuridad durante 8 días o hasta que el hongo cubrió toda la superficie de la placa, a continuación se tomaron trozos del cultivo de 1 cm² y cada uno se utilizó para inocular 3 Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 30 mL de caldo papa dextrosa, luego se incubó durante 8 días a 27°C con agitación a 150 rpm. Transcurrido este tiempo el contenido de los 3 Erlenmeyer se transfirió a una licuadora previamente

esterilizada y se homogenizó durante 30 segundos a máxima velocidad. Inmediatamente, el homogenizado se trasvasó a un Erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizado, dejándose en reposo durante 6 horas antes de ser utilizado como inóculo.

Más tarde, 5mL del inóculo homogenizado se agregó en un Erlenmeyer de 500mL que contenía 125mL de caldo Papa Dextrosa (PD) y se dejó incubar durante 8 días a 27°C con agitación a 150 rpm. Después, el contenido del Erlenmeyer se transfirió a una licuadora previamente esterilizada y se homogeneizó durante 30 segundos a máxima velocidad, luego el homogenizado obtenido, se trasvasó a un Erlenmeyer de 1L previamente esterilizado que contiene una barra magnética, dejándose en reposo.

4.4. Efecto de la concentración del extracto obtenido de frijol quinchoncho sobre la producción de biomasa del hongo *P. ostreatus*.

Para la inoculación de los Erlenmeyer que contiene las diferentes concentraciones de quinchoncho, el inóculo licuado se colocó en un plato de agitación magnética y se agitó durante 30 minutos, transcurrido este tiempo y sin detener la agitación se tomó estérilmente fracciones de 1 ml que utilizó para inocular cada uno de los Erlenmeyer, luego se dejó incubar durante 8 días, a 27°C con agitación a 150 rpm. Transcurrido el tiempo estipulado, el contenido de cada Erlenmeyer se filtró al vacío por separado, recuperándose el micelio, el cual fue transferido a un papel aluminio previamente pesado y rotulado (para las diferentes concentraciones). Finalmente, se guardó en la estufa a 100°C durante 12 horas y luego se pesó cada muestra.

4.5. Cinética de crecimiento de la cepa de *P. ostreatus* BIOMI 104 en medios líquidos a base de extracto de quinchoncho.

Se preparó un medio líquido de quinchoncho de 20g/L (concentración que obtuvo mayor producción de biomasa), seguidamente se aplicó el procedimiento de cocción, filtración y esterilización (según se indicó 4.1), para este caso agregándose 25ml del medio de quinchoncho en 17 Erlenmeyer de 125ml. Posteriormente, el inóculo licuado se colocó en un plato de agitación magnética y se agitó durante 30 minutos, transcurrido este tiempo y sin detener la agitación se tomó estérilmente fracciones de 1 ml que se utilizó para inocular cada uno de los Erlenmeyer, luego se dejó incubar durante 8 días, a 27°C con agitación a 150 rpm. Cada 24 horas se tomaron 3 Erlenmeyer y por separado se filtraron a través de un filtro de tela de nailon, se recuperó el micelio y se transfirió a un contenedor de papel de aluminio previamente pesado, posteriormente se llevó a la estufa a 100°C durante 12 horas, luego se dejó enfriar y se determinó el peso seco de la biomasa. Con los datos resultantes se elaboraron las curvas de crecimiento en cada uno de los tiempos.

4.6. Comportamiento como inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos

Preparación e inoculación del sustrato. Se siguió el procedimiento estándar utilizado en el laboratorio BIOMI para el cultivo de *P. ostreatus* en medios sólidos. La tuza de maíz seca fue molida en un molino de martillo a un tamaño de partícula $\leq$ a 5 mm, se sumergió en agua durante 12 horas para su hidratación, se dejó escurrir durante 6 horas y se empacó en 30 bolsas termo resistentes con capacidad para 500 g conteniendo cada una 250 g de sustrato húmedo, se esterilizó durante 50 minutos, dejándose enfriar y posteriormente se inoculó con 1ml del inóculo homogenizado. Por último, las bolsas inoculadas se colocaron en un estante en un cuarto oscuro y se incubaron a 27°C durante 15 días, diariamente se realizaron observaciones para determinar el grado de invasión.

4.7. Tratamiento estadístico de los resultados

Mediante el software SPSS, se aplicó un ANOVA de una vía, para las comparaciones de los tratamientos y la determinación de las diferencias estadísticas entre los diversos tratamientos se empleó la prueba de rangos múltiples de Tukey, ($\alpha = 0.05$).

Variables evaluadas y sus indicadores

Concentración de harina de quinchoncho

Comportamiento del inóculo líquido en el sustrato tuza de quinchoncho

4.8. Método de evaluación de las variables

Ecuaciones para la cinética de crecimiento

Velocidad de crecimiento

Cambio en la masa celular o en el número de células experimentado por unidad de tiempo. La constante de proporcionalidad μ , un índice de la velocidad de crecimiento que se denomina constante específica de velocidad de crecimiento (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) y tiene unidades de tiempo (h^{-1}) (Arana y colaboradores, 2010). Está definida como:

$$\text{Log } N - \text{log } N_0 = \mu/2,303 (t - t_0)$$

$$\mu = \frac{\text{log}N - \text{log}N_0}{t - t_0} * 2,303 \text{ (Ecuación 1.1)}$$

Donde en la fase exponencial:

Log N₀: biomasa inicial

Log N: biomasa final

t₀: tiempo inicial

t : tiempo final

Tiempo de generación

Definido como el tiempo requerido para que la población se duplique. Durante cada generación se duplican la masa y el número de células (Brock, 2009).

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Producción de biomasa

Biomasa total del hongo generada en cada uno de los medios líquidos

Días de cultivo

Días transcurridos desde el momento en que se inocula el sustrato sólido hasta el corte de los hongos maduros de la cosecha.

Eficiencia biológica:

Definida según la ecuación

$$EB = \frac{\text{Peso fresco de los cuerpos fructíferos obtenido}}{\text{Peso seco del sustrato}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Tasa de producción:

Se evaluó en base a la relación de la eficiencia biológica entre el número total de días de evaluación.

$$\text{Tasa de producción (TP)} = \%EB / \text{días de cultivo} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

Rendimiento %:

(R%): (Peso seco de los carpófagos / peso seco del sustrato) x 100 (Ecuación 1.5)

Productividad:

Productividad **(P):** %R / días de cultivo. (Ecuación 1.6)

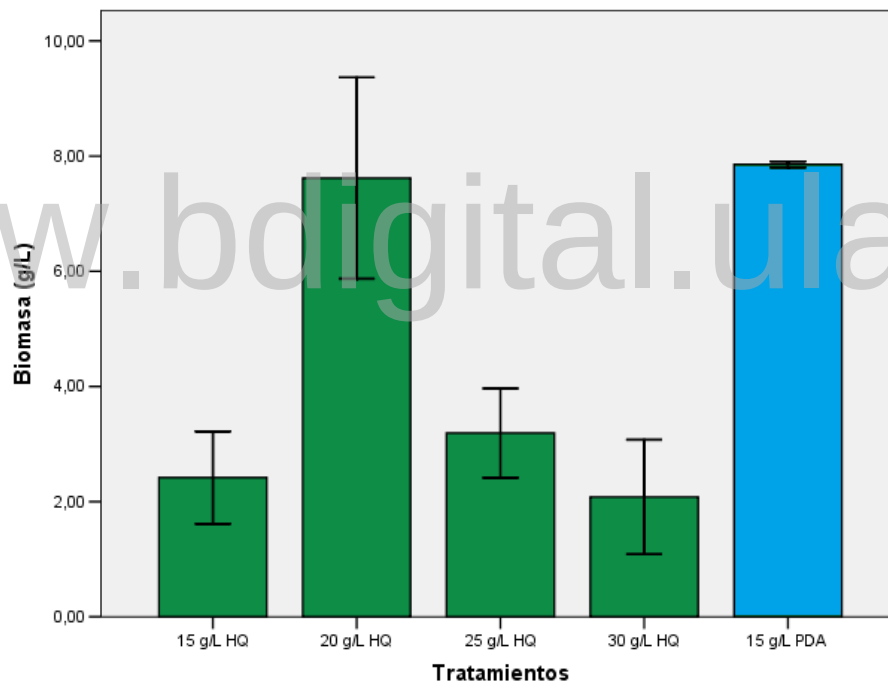
www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Producción de biomasa de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, a diferentes concentraciones de medio líquido de quinchoncho.

En la experiencia se determinó cual es la concentración de quinchoncho donde se obtiene una mayor producción de biomasa, en comparación al control (medio PD). De acuerdo a este estudio se obtuvieron siguientes resultados:



Gráfica 1. Producción de biomasa (g/L) de *P.ostreatus*, obtenida en cada una de las concentraciones de 15, 20, 25, 30g/L de medio líquido de quinchoncho y medio PD (control) a 15 g/L. El experimento consistió en preparar las concentraciones por triplicado, con 25mL de medio, contenido en Erlenmeyer de 125mL, luego se inocularon con 1mL del hongo homogenizado, previamente cultivado en medio PD. Las condiciones de incubación fueron, agitación constante de 120 rpm, durante 8 días a 27°C.

Podemos observar que se obtuvo una mayor producción de biomasa, en el medio PD ($7,86 \pm 0,01$ g/L) y el medio líquido de quinchoncho a 20 g/L ($7,62 \pm 0,41$ g/L), lo cual estudiado en proporciones es tres veces mayor a la biomasa obtenida del tratamiento de 15g/L ($2,42 \pm 0,19$ g seco /L), dos veces mayor al tratamiento de 25g/L ($3,19 \pm 0,18$ g seco/L) y cuatro veces mayor al tratamiento de 30g/L ($2,08 \pm 0,23$ g seco /L) (ver tabla 5.3). Por tanto, en la prueba de ANOVA de una vía, se pudo determinar que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos de quinchoncho de 15, 25 y 30 g/L, con respecto al control (medio PD), sin embargo hubo excepción al comparar el control con el tratamiento de 20 g/L de quinchoncho, demostrando éste último ser mayor y significativamente diferente al resto de los tratamientos, es decir, que a concentraciones más bajas de quinchoncho, se obtuvo mayor biomasa, esto pudiera deberse a los diversos factores entre ellos tenemos:

Los factores antinutritivos de las leguminosas, definidos como una serie de compuestos inhibidores que influyen negativamente en su valor nutritivo, es decir, hacen que limite el consumo de leguminosas, afectando la digestibilidad y disponibilidad de nutrientes. Estos compuestos son clasificados en dos grupos, como termolábiles, que desaparecen tras un adecuado tratamiento térmico y entre los que se encuentran los inhibidores de proteasas, las lectinas, y los glicósidos cianogénicos. El segundo grupo, pertenece a los termoestables (resistentes al calor) que son los compuestos que pudieron afectar la experiencia, tales como los α -galactósidos, fitatos, taninos condensados y saponinas (Aguilera, 2010).

Los α -galactósidos (GOS): son carbohidratos solubles derivados de la sacarosa que contienen de 1-4 unidades de galactosa unidas por enlaces-1,6. El α -galactósido más pequeño es la rafinosa, formada por una molécula de galactosa unida a la sacarosa. Por tanto, sucesivas adiciones de galactosa originan estaquiosa y verbascosa, la cual sólo se encuentra en

trazas en semillas, por lo que no ejerce un papel importante como factor antinutritivo (Aguilera, 2010; Elizalde y colaboradores 2009).

Taninos: Son compuestos polifenólicos de un amplio peso molecular que habitualmente se dividen en hidrolizables y condensados. Estos son capaces de unirse a enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas, y formar complejos con el hierro del alimento, dificultando la digestión de los nutrientes y a su vez conlleva a la precipitación de las proteínas. (Elizalde y colaboradores, 2009). Algunas enzimas digestivas como la tripsina, α -amilasa y lipasa son inhibidas por estos compuestos, lo que provoca una disminución de la digestibilidad de carbohidratos, proteínas y lípidos (Aguilera, 2010).

Saponinas: Son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroideal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Estas sustancias se encuentran en las capas externas del grano (episperma), siendo solubles en metanol o agua. Además, cabe destacar que no ejercen ningún efecto negativo sobre la calidad nutricional de la proteína, pero sí pueden formar complejos con el hierro y el zinc disminuyendo su absorción (Martínez, 2016; Elizalde y colaboradores, 2009).

Ácido fítico o fitatos: se trata del éster hexafosfato de mioinositol, formado por seis grupos fosfato, el cual actúan como un fuerte agente quelante de minerales divalentes, tales como calcio, hierro, magnesio, zinc y cobre. También, interaccionan con residuos básicos de proteínas formando complejos, como proteína-fitato y proteína-fitatomineral, por lo que se paralizan muchas reacciones enzimáticas a nivel digestivo. (Martínez, 2016). Por tanto, este compuesto representa la forma principal de reserva de fósforo utilizado durante la germinación y se encuentra en la piel de la mayoría de los cereales y las legumbres (Aguilera, 2010).

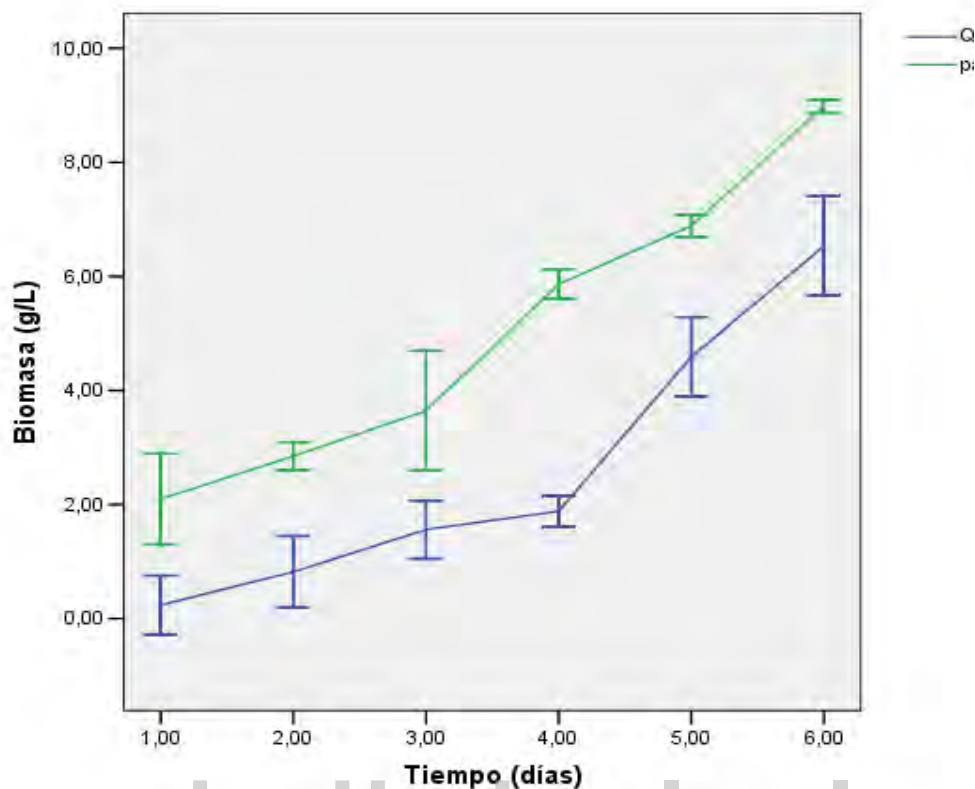
No obstante, a pesar de sus efectos no nutritivos muchos de ellos representan un papel muy importante en la naturaleza. Las lectinas, alcaloides y taninos contribuyen a la resistencia de la planta frente a enfermedades y al ataque de insectos y proporcionan resistencia al estrés medioambiental. Por otra parte, los α -galactósidos sirven como fuente energética para la planta, siendo fundamentalmente utilizados en situaciones de estrés tales como enfriamiento y desecación (Aguilera, 2010).

Tabla 5.1 Proporciones de biomasa de *P. ostreatus*, obtenida en las diferentes concentraciones del medio líquido de quinchoncho.

Medio de cultivo	Concentración (g/L)	N	Media	Error estándar
Quinchoncho	15	3	2,42	0,19
	20	3	7,62	0,41
	25	3	3,19	0,18
	30	3	2,08	0,23
PD control	15	3	7,86	0,01
	total	15		

5.2. Cinética de crecimiento de *P.ostreatus* de la cepa BIOMI 104, utilizando como sustrato medio líquido de quinchoncho a 20 g/L y medio PD a 15 g/L

En la siguiente gráfica, se muestra el crecimiento de *P. ostreatus* a partir de un medio PD a 15 g/L y medio de quinchoncho a 20 g/L, concentración de quinchoncho seleccionada, por su mayor producción de biomasa en la experiencia anterior (ver gráfica 1). Luego, Se determinó las diferentes fases de crecimiento del hongo para cada tratamiento.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento del hongo *P. ostreatus* en medios líquidos de quinchoncho a 20 g/L en comparación al control PD a 15 g/L. Condiciones de cultivo: agitación: 200 rpm, aireación 1 vvm, temperatura 28°C. Tasa de crecimiento en PD 4,08 y HQ 1,93 mg/día.

Durante el crecimiento de *P. ostreatus* para cada tratamiento, podemos determinar las fases de crecimiento, el cual en medio PD su fase de latencia duró hasta el día 3, en comparación al cultivo en medio de quinchoncho que demoró hasta el día 4, por ende en esta fase no se observa crecimiento aparente, ya que el hongo estaba adaptando su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales, es decir, comienza a sintetizar las enzimas necesarias para degradar los nutrientes solubles del medio, componentes necesarios para iniciar la elongación celular y si el hongo sufrió daños durante la siembra en esta fase sintetizará la pared celular y preparará los puntos de crecimiento (Aguilar, 2007). Posteriormente, la fase exponencial, en medio PD comienza desde el día 3 hasta el 6, en el caso del inóculo en medio de quinchoncho establece la fase el día 4 hasta el 6, en donde se duplica la población de células a intervalos regulares, en

ésta el hongo consume al máximo y constantemente los nutrientes presentes en el medio líquido (Aguilar, 2007). No obstante, el comportamiento del inóculo en cada tratamientos fué diferente, en donde la fase de latencia fue más marcada en medio de quinchoncho y la fase exponencial más prolongada en medio PD, esto ocurre porque el hongo está más adaptado al medio PD, donde los nutrientes son más simples fácilmente asimilables. En cambio, en medio de quinchoncho el hongo requiere de una mayor actividad metabólica y tiempo, para degradar los complejos a compuestos simples para su posterior absorción.

Según los resultados de la gráfica 2. Podemos resaltar que el hongo *P. ostreatus*, alcanzó una mayor producción de biomasa de $9,32 \pm 0,03$ g /L en medio PD (15 g/L) en comparación al medio de quinchoncho (20 g/L) de tan sólo $6,35 \pm 0,02$ g /L después de siete días de cultivo, estos resultados difieren con los datos reportados por Aguilar (2007), el cual comparó el crecimiento de *P. ostreatus* de la cepa ECS127R en los siguientes medios de: peptona de caseína con adición de sacarosa (PCS), extracto de malta con adición de sacarosa y extracto de malta desproteinizado (EMD), durante 15 días de cultivo, donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa de 4,18 g/L en EMD, luego sigue el medio PCS con 2,17 g/L y el medio EMS de menor producción con 0,75 g/L, dando como explicación que los medios a base de maltosa contienen 90 a 92% de carbohidratos y el medio de peptona de caseína tiene 10 veces más cantidad de nitrógeno que el resto de los tratamientos, lo que sugiere que los hongos de este género utilizan estrategias simples de degradación de compuestos orgánicos, teniendo mayor éxito con carbohidratos en comparación con compuestos nitrogenados. Estos argumentos son congruentes con los resultados obtenidos, ya que la mejor producción de biomasa se obtuvo en medio PD, donde predominan los carbohidratos en contraste al quinchoncho que contiene más proteínas, lo que favorece que la cepa utilice más rápidamente el sustrato PD, emitiendo menor cantidad de enzimas para degradarlo. Por tanto, el análisis estadístico mediante la prueba de t de variables independientes mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos medios de cultivo estudiados.

Tabla 5.2 Tasa de crecimiento de *P. ostreatus* alcanzada para los medios líquidos de quinchoncho a 20 g/L y PD (control) a 15 g/L.

Medio de cultivo	Concentración (g/L)	Tasa de recambio (d-1)	Tasa de crecimiento (mg/ días)
Quinchoncho	20	0,52	1,93
PD (control)	15	0,25	4,08

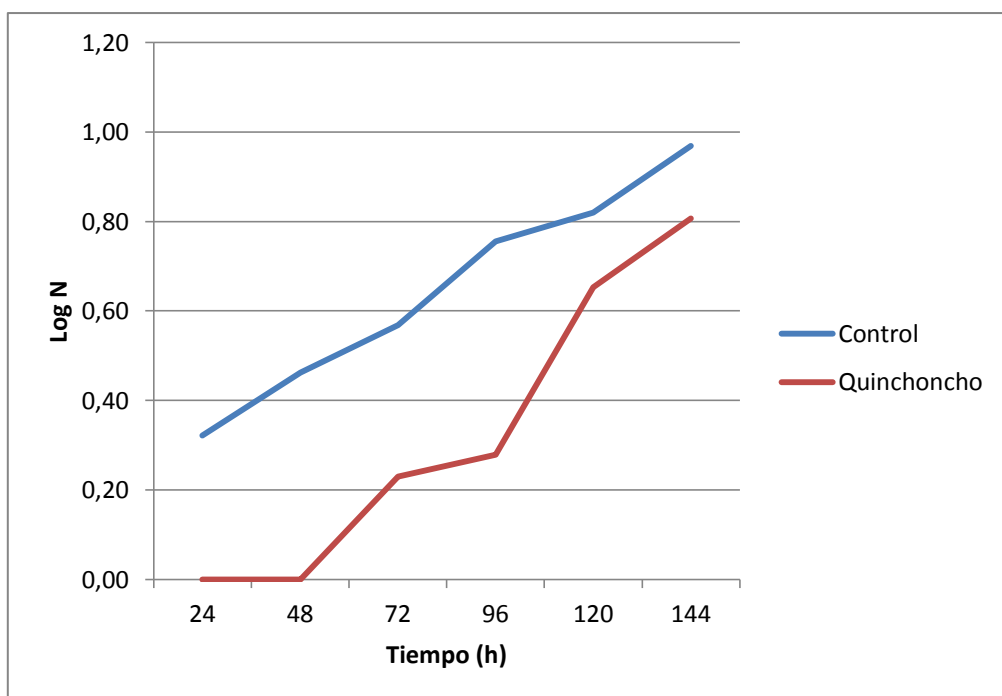
Tabla 5.3 Valores de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de generación (g) de *P.ostreatus* alcanzada para los medios líquidos de quinchoncho a 20 g/L y PD (control) a 15 g/L.

Tiempo (h)	Control Biomasa (g/L)	Log N	Quinchoncho Biomasa (g/L)	Log N
24	2,1	-	0	-
48	2,9	-	0,8	-
72	3,7	0,57	1,7	-
96	5,7	0,76	1,9	0,28
120	6,6	0,82	4,5	0,65
144	9,3	0,97	6,4	0,81
	$\mu(h^{-1})$	0,01		0,03
	g(h)	54,13		27,39

* μ : velocidad de crecimiento

g: tiempo de generación

Para obtener la velocidad de crecimiento del hongo *P.ostreatus*, se aplicó logaritmo en base 10, de la biomasa(g/L) obtenida en el tratamiento PD a 15 g/L y quinchoncho a 20 g/L, sólo en la fase exponencial (ver tabla 5.3) y a partir de los valores se calculó la ecuación 1.1. Posteriormente, obtenida la velocidad de crecimiento se determinó el tiempo de generación (ver ecuación 1.2).



Gráfica 4. Representación semilogarítmica de la biomasa de *P. ostreatus*, obtenida en los tratamiento de PD a 15 g/L y quinchoncho a 20 g/L, con respecto al tiempo.

La mayor velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* fue en el tratamiento de quinchoncho (20g/L) con un valor de $0,03 \text{ h}^{-1}$ en comparación al control (15g/L) de sólo $0,01 \text{ h}^{-1}$, ya que el quinchoncho aporta una fuente rica de proteínas y minerales superior al medio PD, el cual una vez que llega a la fase exponencial el hongo en quinchoncho, comienza a asimilar los nutrientes y su biomasa aumenta de forma gradual. Según reportes de Guillén y colaboradores (1998), analizó la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* en medio sintético con extracto de levadura a diferentes concentraciones de glucosa (0,5-20 g/l), diferentes pH (3,5-6,5) y temperaturas de incubación (23-32°C). Obteniendo como resultado un rango de velocidad de ($0,013$ a $0,027 \text{ h}^{-1}$), siendo menor a la concentración de glucosa de 20 g/L y mayor a la concentración de 2,5 g/L, determinando que al incrementar el suministro de glucosa aumentó la producción de biomasa pero disminuyó su rendimiento. Por tanto, la velocidad crecimiento del hongo cultivado en medio de quinchoncho se encuentra dentro de los intervalos reportados. Por último, en cuanto al tiempo de generación, el hongo en medio PD

requiere un mayor tiempo de 54,13 horas para duplicar su población de células en cambio en medio de quinchoncho sólo requiere 27,39 horas.

5.3 Estudio del comportamiento de *P.ostreatus* de la cepa BIOMI 104, como inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.

El experimento se basó en el cultivo de *P. ostreatus* en medio sólido de tuza de maíz molida, guardadas en bolsas termoresistentes. A partir de inóculos provenientes de medio PD a 15 g/L y quinchoncho a 20 g/L, se prepararon 4 bolsas del sustrato para cada tratamiento y se incubó durante 15 días.

Proceso de fructificación y cosecha

Una vez formados los carpóforos en cada bolsa, se recolectaron, se determinó peso fresco, posteriormente, se disecaron en la estufa y se pesaron nuevamente. A continuación para cada tratamiento, se evaluaron las siguientes variables: eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP), rendimiento (R) y productividad (P).

Tabla 5.4 Cronograma de eventos realizados, para el inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.

Días	Eventos
1	Montaje del experimento.
11	Q: Invasión completa del sustrato en tubo Falcón.
13	- Hidratación del sustrato - Q: Invasión completa del sustrato en bolsa (10 días).
15	PD: Invasión completa del sustrato en tubo Falcón (12 días).
17	PD: Invasión completa del sustrato en bolsa (14 días).
21	Fructificación.

***Q:** inóculo proveniente de medio líquido de quinchoncho

PD: inóculo proveniente de medio líquido de papa dextrosa

Tabla 5.5 Valores de peso fresco y seco del inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.

Recipiente	Bolsas							
tratamiento	Medio PD (control)		Medio de Quinchoncho (Q)		Medio PD (control)		Medio de Quinchoncho (Q)	
Días	P(g) muestra fresca	P(g) sustrato fresco	P(g) muestra fresca	P(g) sustrato fresco	P(g) muestra seca	P(g) sustrato seco	P(g) muestra seca	P(g) sustrato seco
1			Q ₁ =18 Q ₃ =26	Q ₁ =260 Q ₃ =238			Q ₁ =4 Q ₃ =5	Q ₁ =150 Q ₃ =150
2								
5			Q ₂ =36	Q ₂ =256			Q ₂ =7	Q ₂ =150
6	PD ₂ = 25	PD= 224			PDA ₂ = 3	PDA ₂ = 150		
8	PD ₁ =29 PD ₂ =47 PD ₃ =28	PD ₁ = 239 PD ₂ = 213 PD ₃ = 230	Q ₄ =39	Q ₄ =289	PDA ₁ =2 PDA ₂ =5 PDA ₃ =4	PDA ₁ = 150 PDA ₂ = 150 PDA ₃ = 150	Q ₄ =8	Q ₄ =150
9	PDA ₄ =34	PD ₄ = 204	Q ₂ =24	Q ₂ =256	PDA ₄ =4	PDA ₄ = 150	Q ₂ =5	Q ₂ =150
18			Q ₁ =22	Q ₁ =221			Q ₁ =4	Q ₁ =150
25			Q ₃ =33 Q ₅ =57 Q ₁ =29 Q ₄ =24 Q ₂ =19	Q ₃ =201 Q ₅ =212 Q ₁ =185 Q ₄ =243 Q ₂ =203			Q ₃ =7 Q ₅ =11 Q ₁ =6 Q ₄ =5 Q ₂ =4	Q ₃ =150 Q ₅ =150 Q ₁ =150 Q ₄ =150 Q ₂ =150

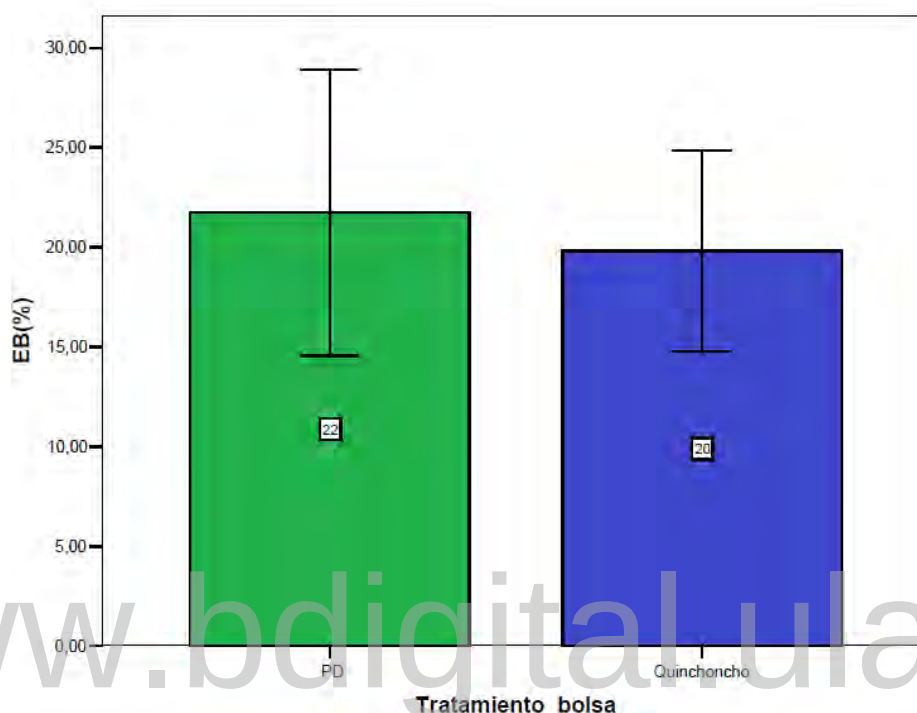
*Q: inóculo proveniente de medio líquido de quinchoncho

PD: inóculo proveniente de medio líquido de papa dextrosa

% Eficiencia biológica (EB)

Como podemos ver en los resultados de la gráfica 3. El inóculo proveniente del medio PD a 15 g/L obtuvo la mejor eficiencia biológica, con un valor de $(21,73 \pm 2,59) \%$, lo cual es 1,10 veces mayor al inóculo del medio de quinchoncho a 20 g/L, que sólo obtuvo $(19,82 \pm 2,27) \%$. Estos resultados concuerdan con los descritos por Sánchez (2008), en los cuales cultivó *P. ostreatus* en cinco sustratos: tallo de palma, paja de avena, tazoles de frijol, paja de trigo y paja de sorgo, obteniendo un rango de eficiencia biológica de 12,82 a 57,49%, donde el menor valor dio en paja de trigo y el mayor en paja de sorgo, por tanto la EB obtenida en quinchoncho se encuentra dentro de los intervalos reportados por

Sánchez (2008). Por otra parte, según el análisis ANOVA de una vía ($F(1,14) = 0,252$, $p < 0,623$), se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.



Gráfica 3. Eficiencia biológica (EB) de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, proveniente de cultivos en medios de quinchoncho 20 g/L y PD (control) a 15 g/L, utilizando como sustrato sólido tuza de maíz molido, con tamaño de partícula ≤ 5 mm.

Tasa de producción (EB/días)

En cuanto a la tasa de producción de *P. ostreatus* de cepa BIOMI 104, en medio PD (15g/L), presentó un intervalo entre 0,48 a 0,92 EB/días, lo cual es mayor al inóculo de quinchoncho (20g/L), de 0,41 a 0,70 EB/días. Por tanto, según la prueba estadística de ANOVA ($F(1,14) = 1,717$, $p < 0,211$), no presentó diferencia significativa entre los tratamientos, lo que indica que la producción de carpóforos diarios en los tratamientos fue homogénea. De acuerdo a la investigación realizada por Díaz y Carvajal (2014), con *P. ostreatus* cultivado en sustratos de fibra de palma y salvado de trigo, obtuvo una tasa de producción

entre 0,46 y 0,64. También existen otros reportes que muestran tasas de producción entre 0.34 y 1.68 sobre sustratos de paja de cebada (Salmones *et al.*, 1997) y entre 1.31 y 4.50 en pulpa de café y viruta de cedro (Bermúdez *et al.*, 2002), por lo que las tasas de producción obtenidas en medio de quinchoncho, se encuentran entre los rangos reportados.



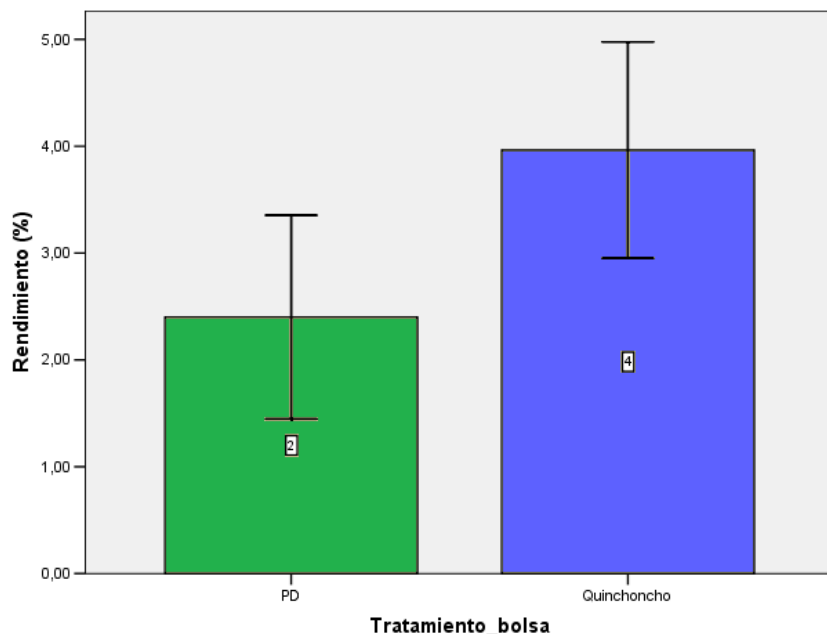
Gráfica 4. Tasa de producción de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, proveniente de cultivos en medios líquidos de quinchoncho a 20 g/L y PD (control) a 15 g/L, utilizando como sustrato sólido tuza de maíz molido, con tamaño de partícula $\leq 5\text{m}$.

% Rendimiento (R)

Podemos resaltar que el rendimiento del inóculo proveniente del medio quinchoncho a 20 g/L fue de 4%, siendo éste en proporciones dos veces mayor al inóculo de medio PD que sólo alcanzó un 2%. También, se pudo determinar mediante el análisis de ANOVA de una vía ($F(1,14)=4,687$, $p < 0,048$), diferencia estadísticamente significativa entre las medias de cada tratamiento, siendo mayor la de quinchoncho, esto indica que los carpóforos de éste último tratamiento

contienen mayor concentración proteínica, reflejado en los valores de peso seco (ver tabla 5.4), en comparación al control, esto se debe a que el hongo proviene de un medio muy complejo como es el quinchoncho, rico en proteínas y minerales, lo que le permite desarrollar una maquinaria metabólica más preparada y una vez que se somete al nuevo sustrato, en este caso tusa de maíz se adapta rápidamente, y lo degrada de forma fácil.

Por tanto, se obtienen mejores resultados con el tratamiento de quinchoncho, ya que contiene como propiedades una fuente importante de proteína (18-32%), conformada por los nueve aminoácidos esenciales: fenilamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Además, presenta bajo contenido de grasa, así como fibra, cantidades de calcio y vitaminas hidrosolubles superiores a las de otros granos, y puede impartir características funcionales deseables en sistemas de alimentos. No obstante, Al igual que el resto de las leguminosas, contiene factores antinutricionales que afectan la digestibilidad y los atributos nutricionales, sin embargo, la proporción de estos es menor que en la soya y desaparecen significativamente al someterse a tratamientos tecnológicos, especialmente térmicos (García y colaboradores, 2018).



Gráfica 5. Rendimiento de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, proveniente de cultivos en medios líquidos de quinchoncho a 20g/L y PD (control) a 15 g/L, utilizando como sustrato sólido tuza de maíz molido, con tamaño de partícula $\leq$ 5mm.

Productividad (%R/ días)

En la evaluación de producción de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, para los diferentes tratamientos, se determinó una mayor productividad en medio de quinchoncho (20 g/L) con un rango de 0,082 a 0,140 % R /días, en comparación al medio PD (15 g/L) con un valor de 0,048 a 0,100 % R/días, luego aplicando el análisis estadístico de ANOVA de una vía ($F(1,14) = 2,604$, $p < 0,129$), demostró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, lo que indica que la producción de carpóforos diarios en los tratamientos fue homogénea. Según Salmones et al. (1997), estudió la producción de cepas de *P. djamur*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, obtuvo rangos de productividad que varían de 0,0067 a 0,0144; 0,0035 a 0,00168: y 0,0034 a 0,0151 %R/d, respectivamente. Comparando estos datos con los obtenidos en la experiencia, los valores de productividad en medio

de quinchoncho, se encuentran por encima de los valores reportados por Salmenes et al. (1997), lo que garantiza el quinchoncho como un eficiente sustrato que cumple con los requerimientos nutricionales para el óptimo crecimiento del hongo.



Gráfica 6. Productividad de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, proveniente de cultivos en medios líquidos de quinchoncho a 20g/L y PD (control) a 15 g/L, utilizando como sustrato sólido tuza de maíz molido, con tamaño de partícula $\leq 5\text{mm}$

CAPITULO VI

CONCLUSIÓN

- En el presente estudio, la mejor concentración de extracto de quinchoncho para el cultivo de *P.ostreatus*, fue de 20g/L, siendo una de las concentraciones más bajas del experimento, este resultado puede deberse a la presencia de los factores antinutritivos propios de las leguminosas, estos compuestos inhibidores que limitan el consumo de proteínas, afectando la digestibilidad y disponibilidad de nutrientes.
- En la cinética de crecimiento, el hongo en medio PD alcanzó en menos tiempo la fase exponencial en comparación al cultivo en medio de quinchoncho, estos eventos se produce por la composición de cada medio, donde el hongo en medio de quinchoncho, requiere una mayor actividad metabólica y tiempo, para degradar los nutrientes disueltos y reducirlos a compuestos simples para poder asimilarlos.
- Por otra parte, se determinó que el inóculo proveniente del medio PD obtuvo una mejor eficiencia biológica en comparación al inóculo de quinchoncho, es decir, que se produjo un mayor peso fresco de carpóforos y en menos tiempo de acuerdo a la tasa de producción. Sin embargo, al estudiar el rendimiento, el inóculo de quinchoncho sacó mayor ventaja en esta variable, ya que los carpóforos de medio PD, contenían gran cantidad de agua pero poco valor nutritivo, demostrado en la considerable reducción de peso al momento de ser disecados. En cambio, los carpóforos del medio de quinchoncho, su estructura estaba basada predominantemente de contenido proteínico.

- Finalmente, podemos constatar, que el sustrato de quinchoncho es un excelente candidato para la producción de inóculos líquidos del hongo *P. ostreatus* a nivel industrial, ya que provee una importante fuente de proteínas, que propicia el crecimiento de carpóforos de buena calidad. No obstante, hay que tomar en cuenta la pequeña proporción de factores antinutritivos que afectan la disponibilidad de nutrientes, lo cuales se logran desaparecer significativamente al someterse a tratamientos tecnológicos, especialmente térmicos.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Aguilar, L. (2007). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp. (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México DF, México.
- Aguilera Gutiérrez Yolanda. (2010). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Agrícola. España-Madrid.
- Arana Inés, Orruño Maite y Barcina Isabel. (2010). PDF. Cálculos de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano. Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco.
- Arana, Y., Burrola, C., Garibay, R., y Franco, S. (2014). Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, 30 (3), 213-226.
- Ardón López Carlos Esduardo (2007). PDF. La Producción de los Hongos Comestibles. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Humanidades. Guatemala.
- Arenas, R. (2008). **Micología médica ilustrada**, México DF, México: Interamericana Mc Graw Hill.
- Bermúdez D., Martínez C., Ramos E. y Morris H. (2002). Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* Var. Florida. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 16:13-18.

- Bonitaz, A. (2012). **Micología médica básica**, México DF, México: Interamericana Mc Graw Hill.
- Bosques Jonael. 2012. PDF. Cultivo de guandul (*Cajanus cajan*) en Florida Central. UF/IFAS Extension Marion County, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville FL 32611.
- Brock. (2009). Biología de los Microorganismos. Madigan – Martinko – Dunlap - Clark. 12a. ed. Editorial Pearson.
- Chang, S., y Miles, P. (2004). **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medical effect, and environmental impact**, New York, EEUU: CRC Press.
- Chegwin, C., y Nieto, I. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. **Revista Mexicana de Micología**, 37, 1-9.
- Díaz C. Claudia y Carvajal R. Eduardo. (2014). PDF. Eficiencia biológica de *Pleurotus ostreatus* cultivado en fibra de palma de aceite. Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona. Colombia
- Donoso, C. (1999). Influencia de la luz en la composición lipídica y proteica del *Pleurotus ostreatus* var. Florida (tesis de maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimboraza, Riobamba, Ecuador.
- Elizalde Ana de Dios, Porrilla Yamid P. y Chaparro Diana C. (2009) Factores antinutricionales en semillas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Colombia.

- Fernández, F. (2004). **Guía Práctica de Producción de Setas *Pleurotus ostreatus***, Guadalajara, México.
- García Oscar, Aiello Mazzarri Cateryna, Peña Chirinos Miriam Coromoto, Ruiz Ramírez Jorge Luis y Acevedo Pons Iria del Carmen (2012). PDF. Caracterización físico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) Sometidos a diferentes procesamientos. Lisandro Alvarado (UCLA). Tarabana, estado Lara. Venezuela.
- Guillén Navarro Gricelda K., Márquez Rocha Facundo J. y José E. Sanchez Vázquez. 1998. PDF. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *P. ostreatus* en cultivo sumergido. Departamento de Biotecnología Ambiental. Tapachula, Chiapas y Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de Acuicultura, Ensenada, Baja California, México.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P., y Woods, G. (2008). **Koneman Diagnóstico Microbiológico**, México DF, México: Panamericana.
- Martínez C. María P. (2016). Antinutrientes proteínicos de las leguminosas: Tipos, toxicidad y efectos fisiológicos. Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. Área de Nutrición y Bromatología. España.
- Martínez, D., y Larqué, A. (1990). Biotecnología en la producción de hongos comestibles. **Ciencia y Desarrollo**, 95, 53-64.
- Martínez, A., Macías, M., Sánchez, L., y Martínez, A. (2002). Fundamental trends of rural mushroom cultivation in Mexico, and their significance for

rural development. IV International Conference on Mushroom biology and Mushroom Products, Cuernavaca, México. 421-431.

- Meynell G., y Maynell E. (1970). ***Theory and Practice in Experimental Bacteriology***, Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Miles, P., y Chang, S. (1997). ***Biología de las Setas. Fundamento básico y acontecimientos actuales***, Hong Kong, China: Scientific World.
- Monterroso, F. (2007). Efecto de la suplementación de la caña de maíz (*Zea mays L.*) con nitrato de amonio, nitrato de potasio y urea en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* (cepa ECS-152) (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Morillo, O., Guerrero, B., Toro, J., Tovar, B., Castañeda, R., García, P., Cuervo, W., y Torres, Y. (2013). Evaluación de la eficiencia biológica de *Pleurotus ostreatus* en hoja de caña y tusa de maíz. ***Revista Científica Observador del Conocimiento***, 2 (1), 213-221.
- Navarro V. Carmen Lucia, Restrepo M. Diego, Pérez M. Jaime. (2014). PDF. El guandul (*Cajanus cajan*) una alternativa en la industria de los alimentos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 12 No. 2 (197-206). Colombia.
- Oei, P. (2003). ***Mushroom Cultivation***, Leiden, Holanda: Backhuys Publishers.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2002). ***Microbiología***, México DF, México: Interamericana Mc Graw Hill.

- Rodríguez, N., y Gómez, F. (2001). Cultivo de hongos comestibles en pulpa de café. Programa de investigación científica. Avances Técnicos 285, Caldas, Colombia.
- Romero, J., Rodríguez, M., y Pérez R. (2000). *Pleurotus ostreatus*. Importancia y Tecnología de cultivo. Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”. Ciudad de Cienfuegos, Cuba.
- Sánchez, J., y Royse, D. (2001). **La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.***, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur.
- Sánchez Cruz Gabriel. (2008). PDF. Determinación de la eficiencia biológica de *Pleurotus ostreatus* en cinco sustratos para su comercialización. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencias Socioeconómicas. Departamento de Administración Agropecuaria. Buenavista. Saltillo. Coahuila. México.
- Salmones D., Gaitán R., Pérez R., Guzmán G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus*: interacción sobre el crecimiento micelial y productividad. Revista Iberoamericana de micología. 14:173-176.
- Solomon, E., Berg, L., Martin, D., y Villee, C. (1996). **Biología de Villee**, México DF, México: Interamericana Mc Graw Hill.
- Stamets, P. (2000). **Growing gourmet and medicinal mushrooms**, Toronto, Canada: Ten Speed Press.
- Stemets, P. (2003). **Mycomedicinal: an information booklet on medicinal mushrooms**, Toronto, Canada: Olympia.

- Zadrazil, F. (1974). Cultivation of *Pleurotus*. En: ***The Biology and Cultivation of edible mushroom***, New York, EEUU: Academic Press.
- Zbigniew, W., y Whistler, R. (1987). Structure and Antitumor activity of Polysaccharides. En: ***Industrial Polysaccharides. The Impact of Biotechnology and advanced methodologies***: Gordon and Breach.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS



www.bdigital.ula.ve



Anexos 1. Análisis estadísticos sobre la producción de biomasa de *P. ostreatus* de la cepa BIOMI 104, a diferentes concentraciones de medio líquido de quinchoncho en comparación al control (medio PD a 15 g/l).

Variable dependiente	Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Media diferencia (I-J)	Stud. Error	Sig.
Quinchoncho Tukey HSD	15 g/l PD	15 g/l HQ	4,327*	0,33817	0,000
		20 g/l HQ	-0,873		0,950
		25 g/l HQ	3,554*		0,000
		30 g/l HQ	4,664*		0,000
	15 g/l HQ	15 g/l PD	-6,553*	0,33817	0,000
		20 g/l HQ	-6,313*		0,000
		25 g/l HQ	-1,886		0,226
		30 g/l HQ	-0,776		0,852
	20 g/l HQ	15 g/l PD	-1,353	0,33817	0,950
		15 g/l HQ	4,087*		0,000
		25 g/l HQ	3,137*		0,000
		30 g/l HQ	4,424*		0,000
	25 g/l HQ	15 g/l PD	-5,780*	0,33817	0,000
		15 g/l HQ	-0,340		0,226
		20 g/l HQ	-5,540*		0,000
		30 g/l HQ	-0,003		0,510
	30 g/l HQ	15 g/l PD	-6,890*	0,33817	0,000
		15 g/l HQ	-1,450		0,852
		20 g/l HQ	-6,650*		0,000
		25 g/l HQ	-2,223		0,510

*HQ: Harina de quinchoncho

*PD: Caldo papa dextrosa

Anexo 2. Análisis estadístico de *P.ostreatus* de la cepa BIOMI 104, proveniente de medio PD (15 g/l) y quinchoncho (20 g/l), como inóculo de la biomasa obtenida mediante pruebas con sustratos lignocelulósicos.

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
EB	PD	5	21,7333	5,78504	2,58715
	Quinchoncho	11	19,8182	7,51940	2,26719
	Total	16	20,4167	6,88907	1,72227
	Model			7,06743	1,76686
	Fixed Effects Random Effects				1,76686 ^a
productividad	PD	5	,0778	,02382	,01065
	Quinchoncho	11	,1116	,04339	,01308
	Total	16	,1010	,04085	,01021
	Model			,03882	,00971
	Fixed Effects Random Effects				,01717
tasa_de_produccion	PD	5	,7039	,17865	,07989
	Quinchoncho	11	,5578	,21697	,06542
	Total	16	,6035	,21163	,05291
	Model			,20675	,05169
	Fixed Effects Random Effects				,07221
rendimiento	PD	5	2,4000	,76811	,34351
	Quinchoncho	11	3,9636	1,50816	,45473
	Total	16	3,4750	1,49466	,37366
	Model			1,33912	,33478
	Fixed Effects Random Effects				,81272

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum
		Lower Bound	Upper Bound	
EB	PD	14,5503	28,9164	16,67
	Quinchoncho	14,7666	24,8698	12,00
	Total	16,7457	24,0876	12,00
	Model	16,6271	24,2062	
	Fixed Effects Random Effects	-2,0334 ^a	42,8667 ^a	
productividad	PD	,0482	,1074	,04
	Quinchoncho	,0824	,1407	,05
	Total	,0792	,1228	,04
	Model	,0802	,1218	
	Fixed Effects Random Effects	-,1171	,3191	
tasa_de_produccion	PD	,4821	,9257	,57
	Quinchoncho	,4120	,7036	,27
	Total	,4907	,7162	,27
	Model	,4926	,7143	
	Fixed Effects Random Effects	-,3141	1,5210	
rendimiento	PD	1,4463	3,3537	1,30
	Quinchoncho	2,9504	4,9768	2,40
	Total	2,6786	4,2714	1,30
	Model	2,7570	4,1930	
	Fixed Effects Random Effects	-6,8516	13,8016	

www.bdigital.ula.ve

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
EB	Between Groups	12,608	1	12,608	,252	,623
	Within Groups	699,281	14	49,949		
	Total	711,889	15			
productividad	Between Groups	,004	1	,004	2,604	,129
	Within Groups	,021	14	,002		
	Total	,025	15			
tasa_de_produccion	Between Groups	,073	1	,073	1,717	,211
	Within Groups	,598	14	,043		
	Total	,672	15			
rendimiento	Between Groups	8,405	1	8,405	4,687	,048
	Within Groups	25,105	14	1,793		
	Total	33,510	15			