

EVALUACIÓN DE TUSA Y CÁSCARA DE MAÍZ COMO SUSTRATOS PARA EL CULTIVO DE *Pleurotus pulmonarius*

C. Infante^{1*}, B. Cuadrado², D. de Arco¹, K. Perez¹, E. Barrera¹ y M. San Juan².

¹Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Campus de Zaragocilla, Área de la Salud, Cartagena de Indias, Colombia.

²Universidad de Cartagena, Facultad de Medicina. Laboratorio del Grupo de Investigación en Microbiología y Sistemas Simbióticos. Campus de Zaragocilla, Área de la Salud, Cartagena de Indias, Colombia.

Recibido enero 2016; aceptado julio 2016

Abstract

Production of edible mushrooms using agroindustrial waste as substrate is an example of a process that degrades organic matter through enzymatic action to form useful products for human consumption. *Pleurotus pulmonarius* culture was studied to evaluate the performance of two agro-industrial wastes. The substrates were corncob and corn husk, which underwent treatment, sterilization, inoculation and incubation under controlled conditions. The mycelium growth time for the cob was 36 days, whereas for the husk was 44 days; there was no significant difference in the biological efficiency, yield and protein content for both substrates. Microbiological analysis showed that the product has a quality suitable for human consumption. From the above results it was concluded that organic wastes corncob and corn husk are suitable for growth, colonization, formation of mycelium and fruiting bodies of *P. pulmonarius*.

Resumen

La producción de hongos comestibles utilizando residuos agroindustriales como sustrato es un ejemplo de un proceso que degrada la materia orgánica, mediante la acción enzimática, para formar productos útiles para el consumo humano. Se estudió el cultivo de la seta *Pleurotus pulmonarius*, para evaluar su comportamiento en dos residuos agroindustriales. Los sustratos fueron tusa y cáscara de maíz, los cuales se sometieron a tratamiento, esterilización, inoculación e incubación bajo condiciones controladas. El tiempo de crecimiento del micelio para la tusa fue de 36 días, mientras que para la cáscara fue de 44 días. No hubo diferencias significativas en la eficiencia biológica, rendimiento y porcentaje de proteína para ambos sustratos. El análisis microbiológico reflejó que el producto tiene una calidad adecuada para el consumo humano. A partir de los resultados anteriores se pudo concluir que los residuos orgánicos tusa y cáscara de maíz son adecuados para el crecimiento, colonización e invasión del micelio y formación de cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius*.

Key words: edible mushrooms, agroindustrial wastes, corncob, corn husk.

Palabras clave: hongos comestibles, residuos agroindustriales, tusa de maíz, cáscara de maíz.

* Autor para correspondencia: cinfante@unicartagena.edu.co

I. INTRODUCCIÓN

Entre las actividades de la sociedad de consumo, el crecimiento demográfico y el incremento de las industrias, se generan un aumento en la producción de residuos, siendo los de naturaleza orgánica o biodegradable los más importantes [1]. Este material normalmente no tiene ningún valor para quien lo posee a nivel agroindustrial, y al ser desechado inadecuadamente, puede generar problemas de contaminación ambiental y de salud. Los residuos, en la mayoría de los casos, no son reutilizados sino simplemente quemados o arrojados a los basureros, quebradas y ríos, sin tratamiento previo, contribuyendo al daño de los ecosistemas [2]. Por lo tanto, la contaminación producida por los residuos sólidos orgánicos sumado a la inseguridad alimentaria, conllevan a la búsqueda de soluciones que aborden de manera simultánea estas dos problemáticas.

La unión de herramientas tecnológicas y técnicas biotecnológicas ha dado pie a una alternativa para la obtención de alimentos para el consumo humano, mejorando calidad, tiempos de cultivo, disminución de costos y utilizando diferentes materias primas. Un claro ejemplo es la producción de hongos comestibles utilizando residuos agroindustriales como sustrato para su cultivo y así la obtención de alimento [3 y 4].

El tratamiento de residuos sólidos es una necesidad y una responsabilidad de todos los estados a nivel global, ya que éstos representan una de las amenazas a las cuales se enfrenta el ambiente, que es el encargado de satisfacer nuestras necesidades presentes y futuras. Proteger y conservar el ambiente es uno de los principales objetivos del milenio de la ONU [5].

Los desechos biológicos contienen varias sustancias reutilizables de alto valor y por lo tanto, es muy atractivo el desarrollo de procesos para tratar y aprovechar estos residuos. Dentro de estas sustancias se encuentra la lignocelulosa y sus componentes, los cuales se constituyen en sustrato de enorme potencial nutricional y valor biotecnológico [6].

Del sector agroindustrial se obtiene un gran porcentaje de residuos. Tal es el caso de los provenientes de la producción de cereales, donde por cada kilogramo de grano, se produce un kilogramo de rastrojo [7]. El maíz es el cereal de mayor utilidad en el mundo, sobrepasando al trigo y al arroz, y genera grandes cantidades de residuos provenientes del cultivo, lo cual justifica su estudio en aplicaciones diferentes [8].

Los residuos agroindustriales se pueden utilizar como material para el cultivo de hongos comestibles por contener una composición similar a los que usan para crecer en su ambiente natural [2]. La biogénesis de las setas está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes que conforman el sustrato y las condiciones climáticas donde se desarrollan [9]. El residuo utilizado puede influir en las cualidades nutricionales de la seta, en cuanto al contenido de proteínas netas, fibra, humedad, cenizas, carbohidratos y grasas totales, que varían con el sustrato empleado y de igual forma, estas variaciones son diferentes dependiendo de la especie [10].

La producción de hongos comestibles es una alternativa importante para satisfacer las necesidades alimenticias de la población, debido a su valor nutricional. Por ejemplo, los hongos del género *Pleurotus* contienen aproximadamente 10% de materia seca y 90 % de agua (similar al vegetal) y la materia seca consta de aproximadamente 20 a 35 % de proteína, a 2 % de grasa, y 5 a 10 % de cenizas con alto contenido de minerales [11]. También dispone de los nueve aminoácidos esenciales, incluyendo leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales) [2]. El consumo de setas reporta efectos positivos en enfermedades cardiovasculares atribuidos a compuestos bioactivos, que promueven el bienestar humano [12].

El género *Pleurotus* es fuente de un potencial biotecnológico muy extenso debido a su gran número de áreas de aplicación como son la ganadera, agrícola, industrial y médica [13]. El rápido crecimiento del desarrollo económico de las especies *Pleurotus* es debido entre otras, a su excelente

calidad organoléptica y crecimiento aceptable en diversos sustratos lignocelulósicos [5]. Por lo anterior, es factible el uso como sustratos de diversas plantas o partes de ellas, ricas en lignina tales como pajas de cereales, estopa de coco, subproductos de la agroindustria (hojas de maíz, vainas de legumbres, etc.). Su capacidad de crecer sobre una diversidad de sustratos, revela un impacto benéfico y promisorio en el aprovechamiento de residuos agroindustriales, considerados hasta hoy como contaminantes [5].

Por toda la problemática que presentan los residuos agroindustriales, se ve la necesidad de impulsar su empleo en otros procesos productivos como el de hongos comestibles; siendo una ventaja adicional que los residuos generados en la obtención de setas (compost agotado), pueden ser reutilizados como materia prima para el cultivo de hongos de otros géneros, como forraje para ganado, como acondicionador del suelo o fertilizante [14]. La composición de los residuos es relativamente adecuada para la alimentación de rumiantes, puesto que en el compost agotado se incrementan los niveles de proteína con respecto al sustrato inicial, contribuyéndose en una mejora en su conservación y en un aumento de la digestibilidad [15].

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar residuos orgánicos provenientes de la actividad agrícola y agroindustrial como la cáscara (amero) y la tusa de maíz, con el fin de determinar su viabilidad como sustrato para el cultivo del hongo comestible *P. pulmonarius*, bajo condiciones ambientales controladas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de los residuos vegetales

La tusa se cortó en trozos de 5 cm de altura y la cáscara se fragmentó en tiras delgadas de aproximadamente 5 mm de ancho. Los residuos vegetales fueron sumergidos en agua del grifo durante 24 horas a temperatura ambiente para su humectación, luego se pesaron aproximadamente 125 g, cubriéndolos con papel aluminio y llevándolos a un autoclave para su esterilización, siendo luego enfriados y empacados en bolsas Ziplock® de 20 x 24 cm.

Como alternativa, se utilizaron frascos de vidrio de 16 cm x 10 cm x 7.5 cm en los cuales se depositó el sustrato para ser esterilizado. En todos los casos se agregó carbonato de calcio (CaCO_3) a razón de un 0.2 % del peso del sustrato contenido en cada bolsa o frasco [16].

La esterilización se realizó en un autoclave marca Gemmy Sturdy SA 300-H durante 1 hora a 121 °C [17], con el fin de reducir los microorganismos propios de los residuos, determinándose la humedad en los sustratos cáscara y tusa de maíz, antes de la esterilización y durante un periodo de 70 horas que duró la incubación de los hongos, mediante el uso de un termohigrómetro EBCHQ en un horno Memmert. Se estableció para el crecimiento del micelio una temperatura de 30 a 32 °C y humedad relativa de 52 %; adicionalmente se tomaron datos en los tiempos 2, 4, 22, 28, 46, 52 y 70 horas, para determinar el porcentaje de humedad mediante el Método Oficial AOAC 934.06 [18].

Preparación del inoculante

La semilla de *P. pulmonarius* suministrada por la empresa SETAS DE LA MONTAÑA S.A.S. (Ibagué- Colombia), fue mantenida en refrigeración a 4 °C, aislándose y purificado el micelio en placas de agar Sabouraud al 2 %. El micelio fue mantenido en refrigeración y reactivado para el estudio, por siembra en tubos de ensayo con agar salvado de trigo inclinado e incubado a 30 °C. De estos se tomaron inóculos y sembraron en agar Sabouraud al 2 %, en cajas de Petri de 100 x 15 mm, hasta obtener una monocapa del micelio del hongo. Las cajas de Petri se incubaron durante 20 días en completa oscuridad a 30 °C [19 y 20]. Las actividades realizadas desde la preparación del inoculante hasta la invasión del micelio se representan en la Figura 1.

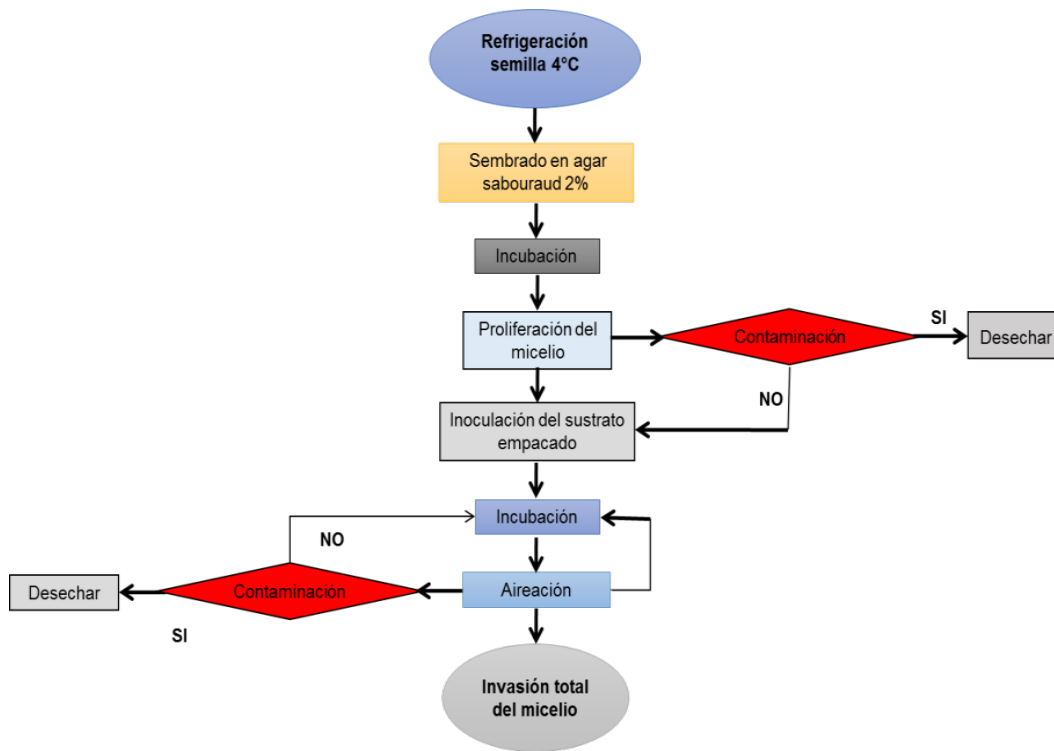


FIGURA 1. Diagrama de flujo de la inoculación a la invasión del micelio.

Inoculación y seguimiento de los sustratos

La siembra se inició en los sustratos fríos después de ser sometidos al tratamiento de esterilización. En la cámara de flujo laminar Marca Esco, se inoculó cada bolsa y frasco de sustrato con discos de 1 cm de diámetro del agar con el micelio. En cada bolsa y frasco se depositó lo correspondiente al 4 % del peso del sustrato, cerrando cada uno para favorecer altas concentraciones de CO₂ [21 y 13].

La incubación o fase oscura, se realizó en una incubadora marca EscoIsotherm, a temperatura de 26 °C, sin iluminación, con observación frecuente para detectar contaminación en los sustratos.

Una vez el sustrato fue invadido por el micelio del hongo, evidenciado por la formación de una capa blanca, se cambiaron las condiciones ambientales con el fin de inducir la formación de los primordios o fructificación [16]. El cambio de las condiciones se llevó a cabo manteniendo el sustrato invadido durante 12 horas a 5 °C, estimulando así, la iniciación primordial [22]. Posteriormente se incubó el sustrato a una temperatura a 22 °C ± 0.5 °C, con un rango de humedad relativa del 70 % al 90 % controlada por el Termohigrómetro EBCHQ. La luz fue suministrada utilizando bombillo luz blanca Starlite de 840 Lúmenes durante un periodo de 8 a 12 horas [23]. Las actividades realizadas desde la fructificación hasta la cosecha se representan en la Figura 2.

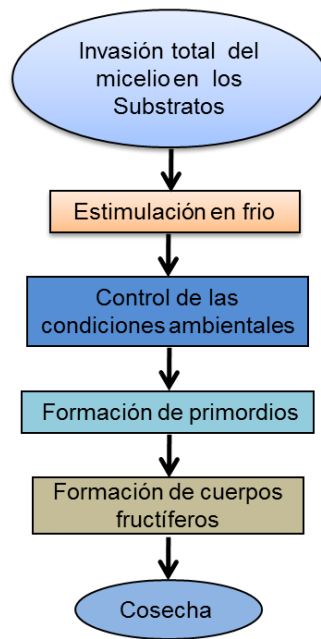


FIGURA 2. Diagrama de flujo desde la formación de primordios hasta la cosecha.

Los hongos se cosecharon al llegar a su madurez la cual se determinó cuando el sombrero estuvo levemente convexo. Los cuerpos fructíferos fueron cortados desde la base del pie y la cosecha duró de 2 a 3 días [21]. Posteriormente se compararon las características morfológicas macroscópicas; y se hizo la medición de la longitud y diámetro del pie y diámetro del sombrero, para cada uno de ellos mediante el uso de un pie de rey.

Rendimiento

La eficiencia biológica se calculó como la relación entre el peso del hongo y el peso de sustrato seco, expresándola en porcentaje [24], empleándose la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia biológica} = \frac{\text{Peso del hongo fresco}}{\text{Peso del sustrato seco}} \times 100 \quad (1)$$

La productividad del proceso se calculó como la relación entre la eficiencia biológica y el tiempo empleado desde la siembra de la semilla hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos utilizando la hoja electrónica del programa Microsoft Excel 2010.

Análisis bromatológico

Entre los parámetros medidos a la seta comestible *P. pulmonarius* se estuvieron el porcentaje de humedad, materia seca y proteína; en cuanto a los sustratos se evaluó porcentaje de humedad, materia seca, proteína y fibra cruda, calculándose la eficiencia y productividad del proceso.

Determinación de humedad

Este procedimiento se le aplicó a los sustratos cáscara maíz, tusa de maíz y al cuerpo fructífero de *P. pulmonarius*, donde se midió el contenido de agua de la muestra por desecación directa en una estufa NEY M525, (Método Oficial AOAC 934.06) [18]. El porcentaje de humedad fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

m1: masa (g) de la muestra antes del secado

m2: masa (g) de la muestra después del secado

Determinación del porcentaje de proteína

Este procedimiento se le realizó a los sustratos cáscara de maíz, tusa de maíz, compost agotado de cáscara maíz, compost agotado de tusa de maíz y al cuerpo fructífero del *P. pulmonarius*. El análisis se efectuó mediante el método de Kjeldahl (Método oficial AOAC 978.04) [18], utilizando el equipo BUCHI modelo K-355 (Unidad de destilación), K-439 (Digestor) y B-414 (Scrubber)

El porcentaje de proteína se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% N = \frac{V \times N \times 1.4}{\text{gramos de muestra}} \quad \% \text{ PROTEINA} = \% N \times \text{Factor} \quad (3)$$

Factor: 5.75 (alimentos vegetales)

Donde:

V: volumen de ácido sulfúrico gastado en la valoración, L.

N: Normalidad del ácido (ácido sulfúrico 0.1 N)

Determinación de fibra cruda

Se determinaron los valores de fibra cruda en los sustratos cáscara y tusa de maíz y en el compost agotado de cáscara y tusa de maíz (Método oficial AOAC 930.10) [18].

Análisis microbiológicos

Estos ensayos se realizaron principalmente para evaluar la calidad microbiológica del proceso, de modo que permitiera obtener un producto inocuo para el consumidor. Las muestras se analizaron a partir de los producidos al final del estudio para ambos tipos de sustrato y como ellos recibieron igual tratamiento, se hizo una muestra compuesta para los análisis microbiológicos, sembrándose por triplicado para cada una de las pruebas de calidad microbiológica. Los resultados fueron comparados con los valores utilizados como referencia para determinar si cumplen con las normas respectivas.

Enumeración de microorganismos indicadores.

Se prepararon diluciones a partir de una muestra compuesta formada por cuerpos fructíferos desarrollados en los sustratos de tusa de maíz y cáscara de maíz. Estos cuerpos fructíferos se maceraron con ayuda de un mortero, pesando aproximadamente 10 g de muestra, siendo llevados a un recipiente estéril con 90 mL de disolución de peptona tamponada 3M™, preparada bajo recomendaciones del fabricante, etiquetando esta solución como 10⁻¹, tomándose posteriormente alícuota de un mililitro el cual se transfirió a un tubo con 9 mL de peptona tamponada. A partir de la primera dilución, se prepararon dos diluciones seriadas adicionales, de modo que al final se obtuvieron las diluciones en base 10: 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ [25].

Se realizaron recuentos de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella* *sp* utilizando Placas 3M™ Petrifilm™ y en el caso de las esporas de *Clostridium* sulfito reductor, tubos con 10 mL de agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) según el manual de normas técnicas del laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, código CQF-B-M-P-01-015 Recuento de esporas *Clostridium* Sulfito Reductor [26].

Para el recuento de aerobios mesófilos se usaron placas 3M™ Petrifilm™ el cual es un sistema con medio de cultivo de muestras listo para usar que contiene nutrientes de métodos estándar, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador tetrazolio (tinte indicador de color rojo) que facilita la enumeración de las colonias [27]. Para la inoculación en la placa 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Aerobios se colocó y por triplicado, un mililitro de cada una de las diluciones de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior, dejándose caer la lámina superior y mediante un dispersor se distribuyó de forma homogénea la muestra, evitando la formación de burbujas de aire, incubándose durante 72 ± 3 horas a 35 ± 1 °C (Método Oficial AOAC 990.1) [18]. Se contaron las colonias coloreadas de rojo, sin importar su intensidad, y el resultado se reportó en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) [28].

En el recuento coliformes y *E. coli*, se emplearon placas 3M™ Petrifilm^{MR} para Recuento de *E. coli* y coliformes. Esta placa está formada por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno conteniendo nutrientes del medio VRBG, el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronido (BCIG) y un agente gelificante soluble en agua fría (el área donde se desarrollarán los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementó en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricoloruro de trifenil tetrazolio (ó TTC) como indicador.

De cada una de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) se tomó una alícuota de 1 mL, siendo sembradas y por triplicado en tres placas Petrifilm 3M para *E. coli* y coliformes, siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas para la identificación de coliformes y 48 horas para *E. coli*. La interpretación de las placas Petrifilm EC, se basó en la identificación y el recuento de colonias de color azul a rojo – azulado asociados con formación de burbujas de gas sin tomar en cuenta la intensidad del color y el tamaño de la colonia. El recuento total de coliformes consistió en la identificación y recuento de colonias rojas y azules asociadas con gas en 24 horas, reportándose en UFC/g y en el caso de *E.coli* de todas las colonias de color azul asociadas con gas y haciendo el reporte de coliformes y *E. coli* en UFC/g [29].

Se realizó el recuento de esporas de *Clostridium* sulfito reductor para determinar la presencia de esporas resistentes al tratamiento de esterilización aplicado al sustrato, dado que el tipo de sustrato que se manejó ha estado en constante contacto con el suelo. Se utilizó el agar sulfito polimixina sulfadiazina (SPS), en el cual las bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, reducen el ión sulfito a sulfuro en presencia de citrato férrico y otras sales de metales pesados, dando origen a colonias negras en condiciones de anaerobiosis. Este análisis se considerada como el recuento indicador más importante de las bacterias anaerobias formadoras de esporas en productos sometidos a tratamiento térmico [26].

En el recuento de esporas se adicionó un mililitro de cada una de las diluciones en tubos de ensayo estériles y por triplicado, siendo calentados a 80 °C por 15 minutos, enfriando los tubos rápidamente en agua fría para activar a las esporas. Posteriormente se adicionaron 10 mL del medio SPS previamente fundido. Cada tubo se dejó solidificar y se le adicionó una segunda capa de medio de 2 mL, dejando nuevamente solidificar para lograr un sello al cultivo, e incubando a 35 ± 2 °C por 3 - 5 días [26]. Transcurrido el período de incubación se hizo la lectura con base en la identificación de tubos que presentaran colonias de color negro y haciendo el reporte en UFC/g.

Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

Las muestras fueron sometidas a la prueba para el aislamiento e identificación de esta bacteria que al ser un microorganismo patógeno de origen entérico, su presencia es inaceptable en el producto final. Se utilizó para la rápida detección cualitativa y la confirmación bioquímica de *Salmonella*, el Sistema 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express [30].

Inicialmente los cuerpos fructíferos se maceraron con ayuda de un mortero y se pesaron 25 g de muestra, los cuales fueron llevados a un recipiente estéril con 225 mL de medio base de enriquecimiento para *Salmonella* 3M™ Petrifilm™, al cual previamente se le adicionó el Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* 3M™ [30]. Se tomó una alícuota de 1 mL de la disolución (10^{-1}) la cual fue sembrada en una Placa 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express (SALX), siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas.

La interpretación se basó en la búsqueda de presuntas especies positivas de *Salmonella* las cuales son colonias que varían del color rojo al marrón con una zona amarilla o una burbuja de gas asociada, o ambas [30]. En caso que se encontrara una colonia sospechosa, el fabricante recomienda el uso del disco de Confirmación 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express (SALX).

Análisis estadístico

Para la comparación de las medias obtenidas en los diferentes ensayos, se realizó el análisis de la varianza, aplicando las pruebas F y Tukey ($p > 0.05$).

Los datos y resultados se analizaron y expresaron, cada uno como el promedio con la desviación estándar correspondiente. Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVII y Microsoft Excel 2010. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad del sustrato

Después de la etapa de humectación, los sustratos presentaron un porcentaje de humedad calculado según la ecuación (2), de 75 ± 2 para la cáscara de maíz y de 70 ± 2 para la tusa de maíz, estableciéndose que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a la humedad inicial. Este contenido de humedad está dentro del rango óptimo para el crecimiento de la cepa de *P. pulmonarius*, el cual se ubica entre 50 y 80 % [14 y 31].

Los resultados del seguimiento a los cultivos para determinar cuál de los sustratos perdía con mayor facilidad el agua retenida se muestran en el Tabla 1, la cual se evidencia que la cáscara de maíz está más propensa a la deshidratación: lo que puede atribuirse a una mayor porosidad y área expuesta. También se puede apreciar que el sustrato de cáscara de maíz presenta mayor porcentaje de pérdida de humedad a lo largo de toda la experiencia; esto demuestra que este sustrato necesita un mayor control de este parámetro. Una rápida desecación podría mermar el crecimiento del hongo y un alto grado de porosidad haría más propenso a los sustratos a una rápida deshidratación, lo cual se traduce en una pobre colonización del micelio [31].

Por otro lado, en los sustratos esterilizados directamente en frascos de vidrio, se evidenció una menor contaminación durante la fase de crecimiento del micelio, debido a la poca manipulación a la que fueron sometidos.

TABLA 1. Datos de humedad de los sustratos tusa y cáscara de maíz con respecto al tiempo, a una temperatura de 32 °C y humedad relativa del 52 %.

Porcentaje de humedad (%)	TIEMPO (horas)						
	2	4	22	28	46	52	70
Tusa de maíz	2.8 ± 0.4	4.7 ± 0.8	18 ± 3	23 ± 4	33 ± 4	36 ± 4	43 ± 4
Cáscara de maíz	4.0 ± 0.5	6.4 ± 0.9	21 ± 3	26 ± 4	36 ± 4	40 ± 5	49 ± 4

Crecimiento micelial de *P. pulmonarius* en cáscara y tusa de maíz

El tiempo de corrida del micelio hace referencia al tiempo que tarda el hongo en colonizar e invadir el sustrato, evidenciado por el cambio de color del residuo a blanco y la compactación del bloque de sustrato. Lo anterior se analizó mediante observación periódica de los sustratos evaluados, bajo las condiciones de temperatura 30 °C, humedad relativa entre 70 a 90 % y oscuridad total [2].

Durante el seguimiento de la propagación del micelio, la cepa logró alcanzar un desarrollo con una velocidad de crecimiento mayor en la tusa, presentando una invasión total del sustrato a los 36 días desde la inoculación, con mejor comportamiento que en la cáscara que solo llegó a la invasión total a los 44 días (Tabla 2). Se han reportado tiempos estimados para el crecimiento de micelio alrededor de 35 días, antes del comienzo de la formación del primordios y la fructificación [5].

La propagación del micelio se presentó solo en los sustratos de tusa de maíz y cáscara de maíz que mantuvieron una humedad propicia para una buena colonización del micelio (Figura 3). Los sustratos con pérdida excesiva de humedad presentaron una disminución de la propagación de micelio (Figura 4); lo que probablemente se debió a que los sustratos que se deshidratan más fácilmente sufren una pobre colonización [31].

TABLA 2. Tiempo de corrida del micelio en los sustratos tusa y cáscara de maíz durante la incubación (Estimado mediante controles visuales).

SUSTRATO	TIEMPO (días)										
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
Tusa	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	TT		
Cáscara	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	TT

TT Invasión total +++ Muy abundante ++ Abundante + Escaso

Fructificación

Una vez que se logró la invasión total del micelio, se procedió a realizar una estimulación en frío para inducir el crecimiento de los primordios, llevada a cabo con 12 horas a 5 °C [22]. Los primeros efectos positivos en la aparición de primordios se dieron pasados los 4 días y el desarrollo total del cuerpo fructífero se detectó a los 7 días de la estimulación en los sustratos invadidos (Figuras 5 y 6).

El número de cuerpos fructíferos recolectados durante la primera cosecha en muestras de 125 g de cada sustrato, fue de 4 ± 2 tanto para la tusa como para la cáscara (Tabla 4). Esto permitió establecer que no existe una diferencia entre el número de cuerpos fructíferos de los dos sustratos. En cuanto a las características para el cuerpo fructífero (Tabla 4 y Figura 7), la longitud del pie o estípite fue de 4 ± 2 cm en tusa y 2.4 ± 0.7 cm en cáscara, encontrándose que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) para esta característica morfológica. El diámetro del sombrero para el

cuerpo fructífero fue de 3.1 ± 0.9 cm en tusa y 3 ± 1 cm en cáscara, mostrando que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), entre el diámetro de los sombreros de las setas cosechadas en los sustratos evaluados. En cuanto al grosor del pie o estípite se encontró que las setas cosechadas en tusa, tenían mayor diámetro en su base (1.75 cm) que las cosechadas en cáscara (1.01 cm), esto evidencia que se ha propiciado el mejor desarrollo del primordio y un mejor cuerpo fructífero. Los cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius*, en sus sombreros, tienen en un diámetro de 10 a 20 cm, con forma de abanico y tallo corto [5].

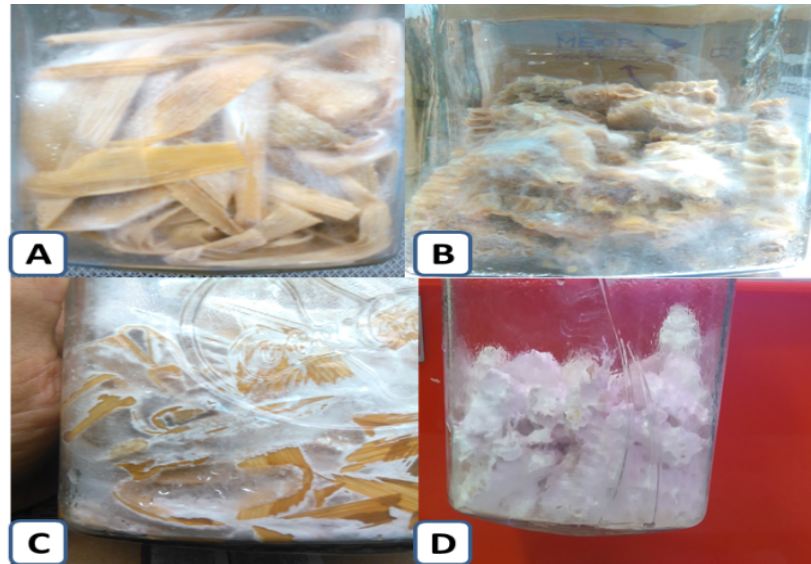


FIGURA 3. Crecimiento de micelio en tusa y cáscara de maíz. A) Colonización de cáscara, B) Colonización de tusa C) Invasión total del micelio en cáscara, D) Invasión total del micelio en tusa.



FIGURA 4. Escasa invasión del micelio en el sustrato cáscara de maíz con bajo contenido de humedad.

Aspectos bromatológicos: Sustratos tusa y cáscara de maíz. Se determinó el porcentaje de proteína según la ecuación (3) y de fibra al sustrato sin micelio y al compost agotado de cada residuo agroindustrial (Tabla 3). Los valores del porcentaje de proteína sobre los pesos secos de los sustratos sin crecimiento de micelio de *P. pulmonarius*, fueron de 2.5 ± 0.1 % para tusa y 1.41 ± 0.01 % en cáscara; mientras que en el compost agotado fue de 4.3 ± 0.3 % en tusa y 5.3 ± 0.4 % en cáscara, existiendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los sustratos sin micelio y el compost agotado con micelio. El aumento de contenido de proteínas, hace que el compost agotado evidencie la bioconversión de los sustratos por el hongo comestible *P. pulmonarius*, mejorando los valores nutricionales y con ello incrementando la probabilidad de un posible uso como alimento para animales, en especial la tusa de maíz, ya que es más apetecible por algunos rumiantes. El mejoramiento en el contenido proteico del compost agotado con micelio puede ser debido a que la composición de la pared celular del micelio es similar a la del cuerpo fructífero del hongo [32].

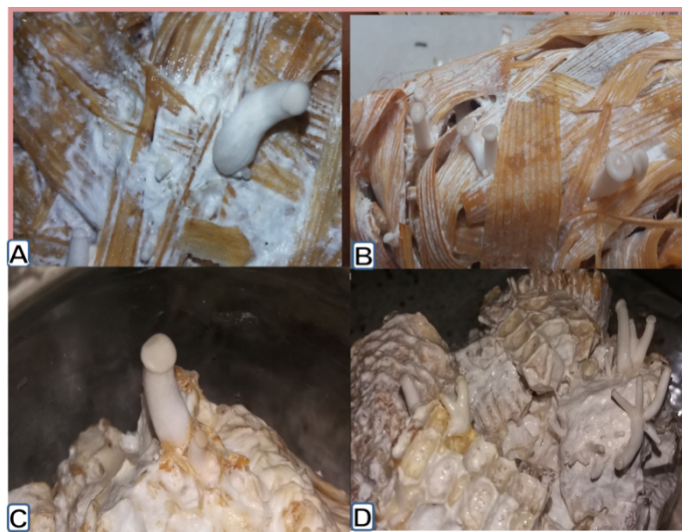


FIGURA 5. Formación de primordios en los sustratos después de 4 días de incubación en los sustratos cáscara de maíz (A y B) y tusa de maíz (C y D)

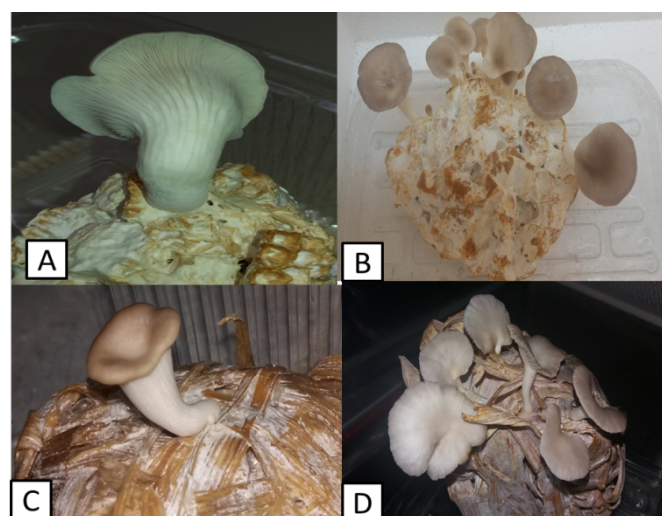


FIGURA 6. Fructificación en los sustratos iniciado a los 7 días de incubación en los sustratos tusa de maíz (A y B) y cáscara de maíz (C y D).

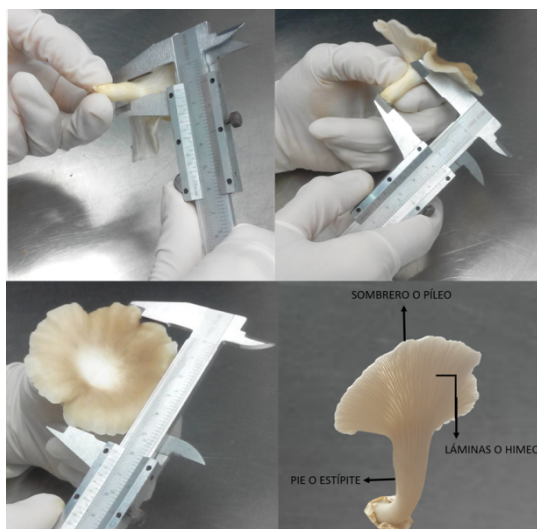


FIGURA 7. Medición del cuerpo fructífero. A) Diámetro del pie, B) Longitud del pie, C) Diámetro del sombrero, D) Partes del cuerpo fructífero.

Los valores de fibra cruda para los dos sustratos fueron de 33 ± 1 % para la tusa y 31 ± 3 % para la cáscara en sustrato sin micelio; mientras que para el compost agotado fue de 29 ± 2 % en tusa y 30 ± 2 % en cáscara. Lo anterior muestra según los datos analizados que no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$), entre los valores de los sustratos evaluados sin micelio y el compost agotado.

TABLA 3. Proteína y fibra cruda de los sustratos cáscara de maíz (CM) y tusa de maíz (TM).

SUSTRATOS	% Proteína	% Fibra cruda
TM sin micelio	2.5 ± 0.1	33 ± 1
Compost agotado TM con micelio	4.3 ± 0.3	29 ± 2
CM sin micelio	1.41 ± 0.01	31 ± 3
Compost agotado CM con micelio	5.3 ± 0.4	30 ± 2

P. pulmonarius

Para el crecimiento de la cepa se utilizaron sustratos a los que no se les agregó ningún tipo de nutriente adicional para incrementar la multiplicación de los hongos reduciendo así los costos en la producción y cultivo de *P. pulmonarius*.

El porcentaje de humedad para el hongo proveniente de la tusa fue de 88 ± 6 % y en cáscara 92.2 ± 0.4 %, encontrándose que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en este parámetro. *P. pulmonarius* tiene un contenido de humedad de 87 a 93% [33].

Los valores de proteína encontrada en el cuerpo fructífero de *P. pulmonarius* fueron 20 ± 4 % en tusa y 20.4 ± 0.7 % en cáscara, encontrándose que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los datos. Similar a los resultados obtenidos por otros autores [32 y 34], evidenciando así el potencial de *P. pulmonarius* sembrado en cáscara y tusa de maíz como fuentes de proteína, mostrando contenidos tan altos como el de otras fuentes de origen animal, tales como pechuga de pollo (21.5 %), parte superior de res (16.7 %), pescado blanco (21.5 %) y huevo de gallina (13.3 %) [35].

TABLA 4. Características de los cuerpos fructíferos cosechados de cáscara y tusa de maíz

SUSTRATO	Hongo <i>P. pulmonarius</i>				
	Nº CF	D (cm)	L (cm)	% Humedad	% Proteína
Cáscara	4 ± 2	3 ± 1	2.4 ± 0.7	92.2 ± 0.4	20 ± 0.7
Tusa	4 ± 2	3.1 ± 0.9	4 ± 2	88 ± 6	20 ± 3

Numero de cuerpos fructíferos (Nº CF), diámetro del píleo (Píleo (D)), longitud del pie (Pie (L))

Rendimiento

La eficiencia biológica (EB), calculada según la ecuación (1), y rendimiento del proceso (RP) de *P. pulmonarius* se muestran en la Tabla 5. Con base en el análisis estadístico realizado, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) para la EB en tusa y cáscara de maíz. En cuanto al RP, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos sustratos ($p > 0.05$).

TABLA 5. Parámetros de productividad de los sustratos cáscara y tusa de maíz

SUSTRATO	% EB	RP	% Humedad
Cáscara	33 ± 10	0.7 ± 0.2	75 ± 2
Tusa	38 ± 13	0.9 ± 0.3	70 ± 3

Análisis microbiológicos

Con el análisis microbiológico más que evaluar la calidad del producto final, se buscó identificar la calidad del proceso de producción, en especial el tratamiento al cual el sustrato fue sometido y de modo que no afecte la inocuidad del producto final.

Recuento de aerobios mesófilos. Se encontró un resultado promedio de aerobios mesófilos de 2×10^5 UFC/g (rango 4.4-9.4 UFC/g), un valor mayor al encontrado por Venturini et al, [36] en 402 muestras de 22 especies de setas frescas cultivadas y silvestres que se venden en los mercados minoristas y supermercados en Zaragoza (España).

Se debe tener en cuenta que la utilidad de este indicador microbiológico depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra. En el caso de este alimento perecedero, pueden haber sido manipulados correctamente y sin embargo desarrollar recuentos elevados, perdiendo calidad, por haberlo almacenado por un período de tiempo prolongado, antes de realizar el análisis. En este caso, el recuento no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por su vida útil.

Es importante tener presente que en alimentos que se someten a tratamiento previo antes de ser consumidos, se puede permitir la presencia de determinados microorganismos, dentro de ciertos niveles, siempre y cuando este tratamiento elimine dicho microorganismo (por ejemplo la cocción). En este sentido, la interpretación del resultado es diferente según se trate de producto crudo o producto cocido o listo para consumir [37].

Recuento de coliformes totales y *E. coli*. En ninguna de las determinaciones se observó crecimiento de colonias características de coliformes y *E. coli*, por lo que el reporte fue < 10 UFC/g, lo cual refleja que no hubo contaminación de origen fecal en el cuerpo fructífero de la cepa *P. pulmonarius*. Por lo tanto, se concluye que se mantuvieron unas condiciones higiénicas, tanto del personal como de las instalaciones, durante la realización de cada uno de los procesos para la obtención del hongo.

Recuento de esporas de *Clostridium sulfito reductor*. El *Clostridium sulfito reductor* es otro indicador de contaminación fecal como la *E. coli*. No se observó el crecimiento de colonias lo que indica un resultado promedio de < 10 UFC/g. Los valores obtenidos indican que no hubo sobrevivencia de microorganismos de origen fecal, en especial esporulados como los *Clostridium*, que hubieran podido estar presentes en los sustratos, convirtiéndose en fuente de contaminación para el cuerpo fructífero de la cepa *P. pulmonarius*.

Aislamiento e identificación de *Salmonella spp*. En ninguna de las muestras analizadas se aislaron colonias sospechosas de *Salmonella spp*, teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante del producto utilizado, y por lo tanto no fueron sujetas a confirmación bioquímica, reportándose como negativas. Este resultado es similar al encontrado por Venturini et al [36] quien tampoco encontró patógenos de origen entérico como *Salmonella spp* y *E. coli* O157:H7.

Estos resultados permiten concluir que el hongo de la cepa *P. pulmonarius* obtenido a partir de los sustratos de cáscara y tusa de maíz utilizados en este estudio, no representa un riesgo para la salud del consumidor en cuanto a enfermedades transmitidas por alimentos debido a microorganismos patógenos como la *Salmonella spp*.

Los residuos orgánicos tusa y cáscara de maíz son adecuados para el crecimiento, colonización e invasión del micelio y formación de cuerpos fructíferos del *P. pulmonarius* bajo condiciones ambientales controladas.

Aunque el periodo de crecimiento del micelio fue menor para la tusa de maíz, no existen diferencias significativas entre los sustratos empleados en términos de la eficiencia biológica y el rendimiento.

Las características morfológicas macroscópicas medidas del hongo *P. pulmonarius*, proveniente de los sustratos tusa y cáscara de maíz, no presentan estadísticamente diferencias significativas, a excepción de la longitud y grosor del pie del cuerpo fructífero, donde fue mayor para la tusa.

Los porcentajes de proteína contenida en los hongos cosechados en los sustratos son comparables y superiores a los reportados en otros estudios similares donde se utilizan sustratos diferentes.

Del análisis microbiológico realizado se concluye que la muestra de cuerpo fructífero de la seta *Pleurotus pulmonarius* sólo evidencia la presencia de aerobios mesófilos con valores promedios de 2×10^5 UFC/g y resultados negativos para los microorganismos indicadores de calidad y eficiencia del tratamiento térmico de los sustratos cáscara y tusa de maíz, como son coliformes, *E. coli*, esporas de *Clostridium sulfito reductor* y el microorganismo patógeno *Salmonella spp*.

IV. REFERENCIAS

1. Quispe, A., Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2015, 6 (1), 83-95.
2. López, C., Hernández, R., Suárez, C., Borrero, M., Universitas Scientiarum 2008, 13 (2), 128-137.
3. Ruiz, M., Aplicación de la ingeniería de matrices en el desarrollo de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) mínimamente procesados, fortificados con vitaminas C, E y minerales calcio y zinc, Tesis magister, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 2009.
4. Suárez, C. & Nieto, I., Revista Iberoamericana de Micología 2013, 30 (1), 1-8.

5. Manyoma, P., Utilización de residuos orgánicos lignocelulósicos provenientes de actividades industriales para la producción de hongos comestibles *pleurotus spp.* en el distrito especial de Buenaventura, Colombia, Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Occidente, Santiago de Cali, Colombia, 2013.
6. Rodríguez, R., Teixeira, J., & Aguilar, C., American Journal of Agricultural and Biological Sciences 2014, 9(3), 289-293.
7. Basurto, R., Escamilla, A., Moya, S., Ramírez, E., Becerra, J., Rev. Mex. Cienc. Pecu. 2012, 3(4), 407-425.
8. Jaraboa, R., Monte, M., Fuente, E., Santos, S., y Negro C., Industrial Crops and Products 2013, 43, 832– 839.
9. Guzmán, M., Zúñiga, N., Santafé, G., Torres, O., y Angulo, A., Facultad de Ciencias Agropecuarias 2009, 7 (2), 63-69.
10. Nieto, I., & Chegwin C., Rev. Colomb. Biotecnol. 2010, XII (1), 169-178.
11. Badole, S., & Bodhankar, S., Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes 2013, 21, 215-220.
12. Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M., Villares, A., y Martínez, J., Fitoterapia 2010, 81, 715–723.
13. Andrino, A. Morte, A., Y Honrubia, M., Anales de Biología 2011, 33, 53-66.
14. Garzón J., & Cuervo J., Ciencias Biomédicas 2008, 6 (10), 101-236.
15. Alborés, S., Pianzola, M., Soubes, M., y Cerdeiras M., Electronic Journal of Boitechnology 2006, 9(3), 215-220.
16. Moonmoon, M., Uddin, N., Ahmed, S., Jahan, N., y Khan, A., Saudi Journal of Biological Sciences 2010, 17, 341–345.
17. Abdullaha, N., Ismailb, R., Khir, N., Annuar, M., Scientia Horticulturae 2013, 161, 65–69.
18. A.O.A.C. (Official Methods of Analysis of the Association of official chemists). (2012). 18a.edic. Arlington Virginia U.S.A.
19. Fernández, J., Henao, L., Pedroza-Rodríguez, A., y Quevedo-Hidalgo, B., Revista Colombiana de Biotecnología 2009, XI (1), 59-72.
20. Guerrero, D. & Padilla L., Producción y extracción de enzimas del *Pleurotus pulmonarius*, utilizando desechos orgánicos inductores, Tesis de pregrado, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias D. T. y C., Colombia, 2014.
21. Cuervo, J., & Rodríguez, J., Cultivo del hongo comestible (*pleurotus ostreatus* jacq. kumm) sobre residuos agroforestales, Produmedios Ltda, Colombia, 2012.
22. Yingyuea S., Minb, G., Qunlia, J., Lijuna, F., Feng, W., Tingtinga, S., Fangfanga, T., C., Scientia Horticulturae 2014, 167,100–106.
23. Kibar, B., Peksen, A., Agricultura Tropica Et Subtropica 2008, 41 (2), 68-73.
24. Heredia, C., Utilización de residuos de brócoli (*Brassicaolerácea itálica*), coliflor (*Brassicaolerácea*) y romanesco (*Brassicaolerácea botrytis*) generados en la empresa Provefrut S.A. para la producción de setas *Pleurotus*, Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador, 2010.

25. Alonso, L., & Poveda, J., Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm TM 3MTM para el análisis de alimentos, Tesis pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2008.
26. Rodríguez, P., & Vergel, E., Manual de normas técnicas del laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, Tesis de pregrado, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias D. T. y C., Colombia, 1996.
27. 3M. (2015)c. Guía de interpretación: 3M™ Petrifilm™. Placas para Recuento de Aerobios. Consultada el 9 de diciembre de 2015, http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/
28. 3M. (2014). Análisis de Microorganismos Indicadores. Consultada el 5 de septiembre de 2014, http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductApplications/IndicatorsPetrifilm/PetrifilmPlates/
29. 3M. (2015)b. Placa Petrifilm^{MR} para Recuento E. coli y Coliformes. Consultada el 9 de diciembre de 2015, http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/
30. 3M. (2015)a. Guía de interpretación: Sistema 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express System. Consultada el 9 de diciembre de 2015, http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/
31. Robles., y Ramírez, M., Aprovechamiento del bagazo residual de *Yucca spp.* como sustrato para la producción de *Pleurotus spp.*, Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, 2012.
32. Smiderle, F., Olsen, L., Ruthes, A., Czelusniak, P., Santana-Filho A., Sasaki G., Gorin, P., Lacomini, M., Carbohydrate Polymers 2012, 87, 368–376.
33. Varnero M., Quiroz M., y Álvarez C, Información Tecnológica 2010, 21(2), 13-20.
34. Oliveira, S., Gomes da Costa, M., y Clemente, E., Brazilian Archives of Biology and Technology 2002, 45(4), 531-535.
35. NEPA., Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Universidad e Estadual de Campinas UNICAMP. In Tabela Brasileira de Composição de Alimentos–TACO (2nd ed.). Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação 2006.
36. Venturini, M., Reyes, J.E., Rivera, C.S., Oria, R. and Blanco, D. Food Microbiology 2011, 28(8), 1492-98
37. Ministerio de Salud de Argentina, Guías de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos, Consultada el 9 de diciembre de 2015, <http://www.anmat.gov.ar/principal.asp>.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Universidad de Cartagena por el apoyo para realizar esta investigación a través de la sexta convocatoria para la financiación de proyectos.