

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CONTAMINANTE DEL
CULTIVO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) EN DIFERENTES RESIDUOS
AGROFORESTALES**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

NEYLA MARISOL CUDRIS GARCIA

DIRIGIDO POR:

**MARTHA STELLA HOLGUÍN HERNÁNDEZ
ICTA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ, 2011**

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CONTAMINANTE DEL
CULTIVO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) EN DIFERENTES RESIDUOS
AGROFORESTALES**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

NEYLA MARISOL CUDRIS GARCIA
CODIGO: 186287

DIRIGIDO POR:

MARTHA STELLA HOLGUÍN HERNÁNDEZ
ICTA

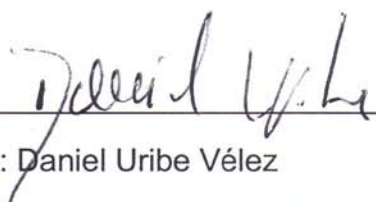
**Trabajo de grado presentado para optar al título de Maestría en Ciencias
Microbiología**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ, 2011

NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en microbiología, el día 27 de enero del 2011.

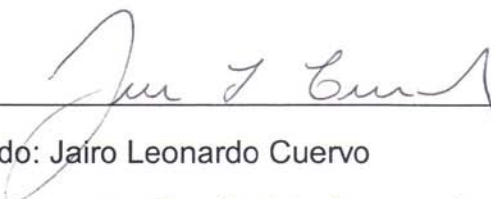
En constancia firman:



Jurado: Daniel Uribe Vélez

Departamento: Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia



Jurado: Jairo Leonardo Cuervo

Departamento: Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de Colombia



Director de Tesis: Martha Holguín H.

Departamento: ICTA

Universidad Nacional de Colombia

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Martha Stella Holguín Hernández y su equipo de trabajo Carolina y Gregorio por orientarme y apoyarme en el desarrollo de la tesis.

Al ICTA y al Postgrado de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo económico y toda su colaboración.

A la Profesora Martha Fontanilla, por asesorarme orientarme y apoyarme.
A Socorro por toda su colaboración.

A las Empresas donde se realizo la investigación por abirme sus puertas al desarrollo del trabajo.

A José Luis Arguello, Nehila Garcia, Edison Cudris y Olga castro por su apoyo y compañía.

CONTENIDO

2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 El Shiitake	3
2.2 Taxonomía.....	4
2.3 Ciclo de Vida	4
2.4 Composición.....	5
2.5 Etapas de desarrollo del Shiitake	6
2.5.1 Etapa 1. El crecimiento del micelio:	6
2.5.2 Etapa 2. Formación del escudo del micelio:	6
2.5.3 Etapa 3. Formación de ampolla, o de palomitas de maíz:	6
2.5.4 Etapas 4. y 5. Browning y la formación de la corteza:	7
2.6 Cultivo Shiitake.....	7
2.7 Sustratos	8
2.8 Condiciones de cultivo	9
2.9 Contaminación en el cultivo de Shiitake	10
3. PROBLEMA.....	14
5.1 OBJETIVO GENERAL	17
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1 Diseño experimental.....	19
6.2 Identificación de hongos contaminantes:.....	20
6.3. Identificación de bacterias contaminantes:.....	20
6.4 Evaluación de especies contaminantes antagónicas	21
6.5 Análisis de los contaminantes por sustrato:	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 Hongos contaminantes en las diferentes etapas de desarrollo	22
7.3.1 <i>Trichoderma crassum</i>	32
7.3.2 <i>Trichoderma aggressivum</i>	34
7.3.3 <i>Trichoderma harzianum</i>	37
7.3.4 <i>Trichoderma viride</i>	40
7.3.5 <i>Hypocrea cremea</i>	43
7.3.6 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	45
7.3.7 <i>Penicillium roseopurpureum</i>	47
7.3.8 <i>Penicillium raciborskii</i>	49
7.3.9 <i>Rizopus stolonifer</i>	51
7.3.10 <i>Penicillium spinulosum</i>	53
7.3.11 <i>Penicillium brevicompactum</i>	55
7.3.12 <i>Trichoderma atroviride</i>	57
7.4.1 <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	61
7.4.2 <i>Aerococcus viridans</i>	62
7.4.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
7.4.4 <i>Micrococcus spp.</i>	65
7.4.5 <i>Burkholderia sp.</i>	66
7.4.6 <i>Bacillus brevis</i>	70
7.4.7 <i>Bacillus cereus</i>	71

7.4.8 <i>Klebsiella oxytoca</i>	73
7.4.9 <i>Enterobacter aerogenes</i>	75
7.4.10 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	76
7.5 Análisis de la relación existente entre el tipo de sustrato y las especies de hongos encontradas	78
7.6 Análisis de la relación existente entre el tipo de sustrato y las especies de bacterias encontradas	81
7.7 Consideraciones Finales	83
8. CONCLUSIONES	84
10. BIBLIOGRAFÍA	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida del Shiitake.....	5
Figura 2: Resumen de la metodología utilizada en el objetivo 1.....	18
Figura 3: Resumen de la metodología utilizada en el objetivos 2 y 3.....	18
Figura 4: diagrama del diseño experimental.....	19

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Frecuencias de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto- salvado de trigo (Bogotá).	23
Gráfica 2: Frecuencia de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto- cascarilla de arroz (Salto del Tequendama).....	24
Gráfica 3: Frecuencias de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en amarillo-salvado de trigo (Bogotá).	26
Gráfica 4: Frecuencias de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto-salvado de trigo (Bogotá). ..	28
Gráfica 5: Frecuencia de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto-cascarilla de arroz (Salto del Tequendama).....	29
Gráfica 6: Frecuencias de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en amarillo-salvado de trigo (Bogotá). ...	31
Gráfica 7: Análisis de Correspondencias Simples entre el tipo de sustrato utilizado y las especies de hongos	80
Gráfica 8: Análisis de Correspondencias Simples entre el tipo de sustrato utilizado y las especies de bacterias.....	82

INDICE DE FOTOS

Foto 1: Shiitake.....	3
Foto 2: Colonia de <i>T. crassum</i> en medio de cultivo PDA	32
Foto 3: <i>T. crassum</i> visto al microscopio (40 X).	32
Foto 4: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>T. crassum</i> :	33
Foto 5: Colonia de <i>T. aggressivum</i> en medio de cultivo PDA	34
Foto 6: <i>T. aggressivum</i> vista al microscopio (40 X).	35
Foto 7: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>T. Aggressivum</i>	36
Foto 8: Colonia de <i>T. harzianum</i> en medio de cultivo PDA.....	37
Foto 9: <i>T. harzianum</i> vista al microscopio (40 X).....	38
Foto 10: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>T. harzianum</i>	38
Foto 11: Colonia de <i>T. viride</i> en medio de cultivo PDA.....	40
Foto 12: <i>T. viride</i> visto al microscopio (40 X)..	40
Foto 13 Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>T. viride</i>	41
Foto 14: Colonia de <i>H. cremea</i> en medio de cultivo PDA.	43
Foto 15: <i>H. cremea</i> vista al microscopio (40 X).	43
Foto 16 Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>H. cremea</i> :	44
Foto 17: Colonia de <i>C. cladosporioides</i> en medio de cultivo PDA..	45
Foto 18: <i>C. cladosporioides</i> visto al microscopio (40 X).	45
Foto 19: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>C. cladosporioides</i>	46
Foto 20: Colonia de <i>P. roseopurpureum</i>	47
Foto 21: <i>P. roseopurpureum</i> visto al microscopio a la izquierda 40X.....	47
Foto 22: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>P. roseopurpureum</i>	48
Foto 23: Colonia de <i>P. raciborskii</i>	49
Foto 24: <i>P. raciborskii</i> visto al microscopio (40X).	50
Foto 25: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>P. raciborskii</i> :	50
Foto 26: Colonia de <i>R. stolonifer</i> en medio de cultivo PDA	51
Foto 27: <i>R. stolonifer</i> visto microscopio a 10X y a la derecha visto a 40X..	52
Foto 28: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>Rizopus stolonifer</i>	52
Foto 29: Colonia de <i>P. spinulosum</i> en medio de cultivo agar CzapeK.....	53
Foto 30: <i>Penicillium spinulosum</i> vista al microscopio (40X).....	54
Foto 31: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>P. spinulosu</i> :	54
Foto 32: Colonia de <i>P. brevicompactum</i> en medio de cultivo agar CzapeK .55	55
Foto 33: <i>P. brevicompactum</i> visto al microscopio (40X).	56
Foto 34: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>P. brevicompactum</i> :	56
Foto 35: Colonia de <i>T. atroviride</i> en el medio de cultivo PDA	57
Foto 36: <i>T. atroviride</i> a la izquierda vista al microscopio (40X).....	58
Foto 37: Cultivo de <i>L. edodes</i> vs <i>T. atroviride</i>	59
Foto 38: <i>S. paucimobilis</i> cultivado en Agar Sangre.	61
Foto 39: <i>L. edodes</i> vs <i>S. paucimobilis</i> cultivados en AN.....	62
Foto 40: <i>A. viridans</i> cultivado en Agar Sangre..	62
Foto 41: <i>L. edodes</i> vs <i>A. viridans</i> cultivados en AN.	63
Foto 42: <i>A. tumefaciens</i> cultivada en Agar Sangre.	64
Foto 43: <i>L. edodes</i> vs <i>A. tumefaciens</i> cultivados en AN	64
Foto 44: <i>Micrococcus spp.</i> , cultivado en Agar Sangre..	65

Foto 45: <i>L. edodes</i> vs <i>Micrococcus sp.</i> , Cultivados en AN.	66
Foto 46: <i>Burkholderia spp.</i> , cultivada en AN.....	66
Foto 47: <i>L. edodes</i> vs <i>Burkholderia sp</i> cultivados en AN.....	67
Foto 48: Primordio de <i>L. edodes</i> inoculado con <i>Burkholderia spp.</i>	68
Foto 49: <i>L. edodes</i> a la izquierda vs <i>Burkholderia spp.</i> , y <i>T. crassum</i>	69
Foto 50: <i>B. brevis</i> cultivado en AN.....	70
Foto 51: <i>L. edodes</i> vs <i>B. brevis</i> cultivados en AN.....	70
Foto 52: <i>B. cereus</i> cultivado en AN.....	71
Foto 53: <i>L. edodes</i> vs <i>B. cereus</i> , cultivados en AN:.....	72
Foto 54: <i>K. oxytoca</i> cultivada en Agar Sangre.	73
Foto 55: <i>L. edodes</i> vs <i>K. oxytoca</i> cultivados en AN.	74
Foto 56: <i>E. aerogenes</i> cultivado en cultivo Agar Sangre.	75
Foto 57: <i>L. edodes</i> vs <i>E. aerogenes</i> cultivados AN.....	75
Foto 58: <i>S. maltophilia</i> cultivada cultivo Agar Sangre	76
Foto 59: <i>L. edodes</i> vs <i>S. maltophilia</i> cultivados en AN:	77

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones ambientales para el cultivo de Shiitake en las diferentes etapas de desarrollo. Datos obtenidos de la planta Bogotana productora de Shiitake.	10
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

En este estudio se caracterizó la microbiota contaminante relacionada con el cultivo de *Lentinula edodes*, en sus diferentes etapas de desarrollo y en diferentes residuos agroforestales.

Se trabajó con muestras obtenidas de tres sustratos provenientes de dos empresas cultivadoras de Shiitake. Se caracterizaron los hongos contaminantes por análisis morfológicos y las bacterias contaminantes utilizando la técnica @BBL CRYSTAL, se realizaron cultivos duales de cada una de las especies contaminantes encontradas con *L. edodes*, para analizar si estas especies afectaban en alguna medida el desarrollo del hongo. Por último se estableció la influencia del tipo de sustrato con las especies contaminantes encontradas realizando un análisis de correspondencias simples.

Se aislaron y caracterizaron 12 especies de hongos contaminantes: *Trichoderma aggressivum*, *T. atroviride*, *T. crassum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *Hypocrea cremea*, *Penicillium roseopurpureum*, *P. raciborskii*, *P. brevicompactum*, *P. spinulosum*, *Cladosporium cladosporoides* y *Rizopus stolonifer*. Además 10 especies de bacterias contaminantes: *Aerococcus viridans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus spp.*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Se encontró influencia de las etapas de desarrollo de *L. edodes* con el tipo de especies de hongos contaminantes aislados en cada sustrato lo cual no ocurre con el tipo de bacterias contaminantes. Se reportó antagonismo entre varios de los organismos contaminantes con *L. edodes* y se evidenció dependencia entre el tipo de sustrato utilizado y las especies de hongos y bacterias encontradas.

ABSTRACT

In this study, the microbiota contaminant associated with *Lentinula edodes* cultivation in their different stages of development and in different agro-waste substrates were characterized.

Three substrate samples from two Shiitake farming enterprises were evaluated. Fungal contaminants were characterized by morphological analysis and bacterial contaminants using the BBL CRYSTAL® technology, dual cultures were performed for each of polluting species with *L. edodes*, to examine whether these species to some extent affected the development of the fungus. Finally, we established the influence of substrate type of pollutant species found by simple correlation analysis.

Twelve species of contaminating fungi were isolated and characterized. *Trichoderma aggressivum*, *T. Atroviride*, *T. crassum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *Hypocrea cremea*, *Penicillium roseopurpureum*, *P. raciborskii*, *P. Brevicompactum*, *P. spinulosum*, *Cladosporium cladosporoides* and *Rizopus stolonifer*. Otherwise, eleven species of contaminating bacteria were isolated, *Aerococcus viridans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus spp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, and *Stenotrophomonas maltophilia*.

There is an influence of the developmental stages of *L. edodes* with the type species of fungal contaminants found in each substrate which does not happen with the type of contaminating bacteria. Reported antagonism among some contaminants organisms with *L. edodes* and revealed dependence between the type of substrate used and the species of fungi and bacteria found.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia se está empezando a incluir en la cultura alimenticia el consumo de hongos comestibles como el champiñón, la orellana y el Shiitake; hongos que tienen toda una tradición de cultivo y consumo según afirma García¹, en países como China, Japón, y Corea y se ha expandido a otros países del mundo como Filipinas, Francia, Inglaterra, España, Alemania y más recientemente Estados Unidos y América latina.

Dentro de los hongos comestibles el Shiitake (*Lentinula edodes*) es un hongo que posee propiedades alimenticias y medicinales importantes para el ser humano, se destaca por sus insuperables características organolépticas, contiene además el doble del contenido de proteínas que los vegetales y según Chimara², tiene un componente conocido como lentinan que ha demostrado ser un agente anti infeccioso y anti-cancerígeno y contiene principios activos que reducen el colesterol y la glicemia y son activadores del sistema inmune. Es por esto que se hace importante el consumo de este hongo.

El cultivo de Shiitake en Colombia puede convertirse en una alternativa de alimentación de bajo costo al utilizar los residuos agrícolas y agroforestales como sustrato para su siembra, favoreciendo así a las familias campesinas de bajos recursos. El cultivo de este hongo además se está convirtiendo en una oportunidad de generar nuevos productos y mercados, si se tiene en cuenta la gran cantidad de residuos agrícolas y agroindustriales que se generan en el país.

Los residuos agroforestales que se generan en el campo como los del maíz, trigo, sorgo, avena y cebada sobrantes de los cultivos de arroz, frijol, y los residuos agroforestales provenientes de maderas de pino, encino, eucalipto, sajo, amarillo, roble, son una buena fuente de nutrientes para los hongos comestibles ya que estos organismos son capaces de descomponerlos y metabolizarlos eficientemente.

El cultivo de Shiitake presenta ventajas económicas para su producción como la utilización de este tipo de residuos y los buenos precios que tiene en

¹GARCÍA I. Proyecto experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake) y su desarrollo químicobiológico. Proyecto de tesis para optar título de Licenciada en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 2003

² CHIMARA, G. Aspectos medico del lentinan aislado del *Lentinus edodes* (Berk). Singer, en Mushroom Biology, concise Basics and current developments. Primera edición, ed. por. Miles Philip & Chang Shu-Ting. World Scientific. Singapore. 1993, pp. 114-116.

el mercado. Pero a su vez presenta dificultades como la fácil contaminación de los cultivos producto de un manejo no adecuado que se pueden llegar a convertir en un gran problema.

La contaminación de los cultivos de Shiitake ha afectado en gran medida a las empresas productoras de este hongo. Seaby³, afirma que los ataques de hongos contaminantes como *Trichoderma aggressivum* a los cultivos de Shiitake pueden ser tan severos que han originado pérdidas del 30% al 100% en las plantas de producción y pérdidas económicas de más de 100 millones de dólares anuales.

Según Sobobal et al⁴ en el diagnóstico de las plagas, enfermedades y competidores en plantas productoras de hongos comestibles, realizado en la región central de México, se demostró que el principal agente biológico nocivo de las plantas productoras (*Trichoderma spp.*) puede llegar a alcanzar un nivel de incidencia hasta del 50% en las unidades de producción contaminadas consideradas en la muestra.

Por lo cual es necesario estudiar y comprender mejor que como ocurre la contaminación en los cultivos de Shiitake, que organismos están involucrados, su forma de acción y las estrategias a implementar para su control.

El propósito de este trabajo es realizar la caracterización de los hongos y bacterias contaminantes del cultivo de *Lentinula edodes*, en sus diferentes etapas de desarrollo y en diferentes residuos agroforestales, con el fin de entender mejor que organismos atacan el cultivo de Shiitake y como el tipo de sustrato y la etapa de desarrollo influyen en el tipo de contaminantes presentados.

³SEABY, D. A. *Trichoderma* as a weed mold or pathogen in mushroom cultivation. 1998, pp. 267-287, citado por Harman G. E. y Kubicek C. P. Taylor & Francis *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications., Londres 1998.

⁴ SOBAL, M., MORALES P., BONILLA M., HUERTA G. & MARTÍNEZ-CARRERA D. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 2007. pp 14, citado por SÁNCHEZ D., MATA G. y LEAL H. El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México. J. E., ECOSUR-CONACYT, México, D.F. 2007.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El Shiitake

Lentinula edodes (Berkely) Pegler 1978, también conocido con el nombre de Shiitake, es un hongo basidiomiceto, originario de China, Japón y Corea, según la Universidad de Extremadura⁵, se desarrolla en árboles muertos de hoja ancha, principalmente en el Roble, se caracteriza por presentar sombrillas hemisféricas sostenidas por un tallo fibroso. Estas sombrillas aplanadas al madurar, miden entre 5 y 25 cm de ancho y se van tornando cafés a medida que desarrolla el hongo (foto 1 parte izquierda).

En cultivo en Papa Dextrosa Agar (PDA) forma una colonia de color blanco, radial y de textura algodonosa (foto 1 parte central).



Foto 1: Shiitake: A la izquierda cuerpos fructíferos del Shiitake en el centro Colonia de Shiitake en medio PDA y a la derecha micelio de Shiitake visto a 40X. Fuente Autor 2010.

A nivel microscópico, Se observa un micelio blanco con hifas formado un entramado en forma de malla (foto 1 parte derecha), que con el tiempo empiezan a segregar sustancias protectoras de color marrón. Se observan esporas blancas, de forma ovoide que se agrupan en basidiosporas.

El Shiitake se utiliza comúnmente como alimento pero se han descrito algunas propiedades medicinales, según Yeung y Gubui⁶ posee propiedades anti-cancerígenas debido al Lentinan (1,3-β-D-glucano), un polisacárido, que

⁵ Universidad de Extremadura. Basidiomicetos 2002 <http://www.unex.es/botánica/LHB/bacidiomicetos/basidio.2htm>. en RENDÓN M. DE VILLEROS P. "Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del Shiitake (*Lentinula Edodes*) en cultivo sumergido" Universidad Eafit Escuela de Ingenierías Departamento de Ingeniería de procesos Medellín 2004

⁶ YEUNG KS, GUBUI J. Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*).Journal of the Society for Integrative Oncology; Summer, Vol. 6 Issue 3, 2008, pp. 134-134, 1p.

ha mostrado efectos anticancerosos en las células de cáncer de colon, al reprimir el citocromo P-450, un grupo de enzimas conocidas por su capacidad para metabolizar pro-carcinógenos de activos. Además posee un componente de proteínas que han demostrado inhibir la proliferación de células leucémicas, y suprimir la actividad del virus de la inmunodeficiencia humana, este compuesto es conocido como Lentin.

Este autor también afirma que en la actualidad hacen falta realizar estudios para confirmar beneficios de shiitake pues en algunos casos se han mostrado efectos adversos al consumir Shiitake por ejemplo el consumo prolongado de polvo de shiitake ha reportado casos de dermatitis, fotosensibilidad, eosinofilia y malestar gastrointestinal .

2.2 Taxonomía

Taxonómicamente el Shiitake ha sido clasificado en varios géneros Stamets⁷, afirma que desde 1877, cuando Berkely lo propuso como *Agaricus edodes*, ha cambiado a los géneros *Collybia*, *Armillaria*, *Lepiota*, *Pleurotus* y *Lentinus*. En 1978 Pegler lo denominó como *Lentinula edodes* por encontrar diferencias microscópicas con respecto a *Lentinus*.

Según Kira et al⁸ se clasifica dentro del Reino Fungí, División *Eumycota*, subdivisión *Dikarymycota*, Phylum *Basidiomycota*, Clase *Homobasidiomycetes*, Orden *Agaricales*, Familia *Tricholomataceae*, género y especie *Lentinula edodes*

2.3 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Lentinula edodes* acorde a lo expuesto por Chen⁹, comienza con la generación de basidiosporas haploides uninucleadas producidas por meiosis, las cuales en un ambiente favorable germinan dando lugar a un micelio primario uninucleado haploide llamado homocarión como se muestra en la figura 1

⁷ STAMETS, P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Toronto: Ten Speed Press, 2000, pp. 259 – 276. En: RENDÓN M. DE VILLEROS P. “Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido” Universidad Eafit Escuela De Ingenierías Departamento De Ingeniería De Procesos Medellín. 2004.

⁸ KIRK ET AL. Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi, Ed. 9. 2001.

⁹ CHEN, A. W. What is Shiitake? In The Mushroom Growers Handbook 2: Shiitake Cultivation, Seoul, Korea MushWorld. 2005 pp 1-11.

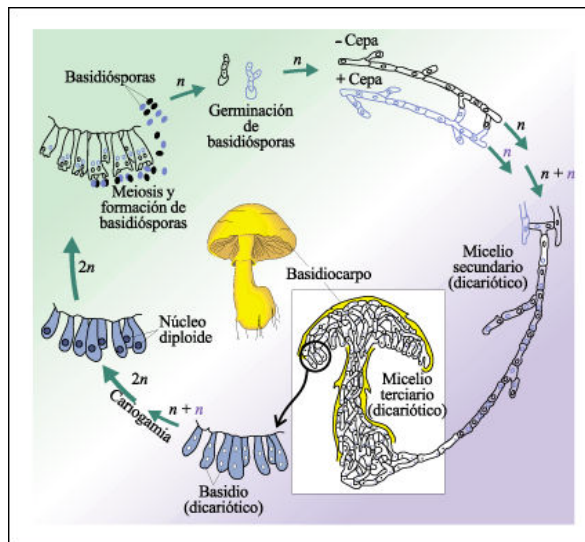


Figura 1: Ciclo de vida del Shiitake.

Fuente: hongoscomestiblesyvenenosos.blogspot.com/

Durante la fase sexual dos cepas de basidiosporas compatibles se unen para formar el dicarion del cual crece un micelio secundario. En el micelio secundario se forman los primordios que se convertirán en cuerpos fructíferos en forma de sombrilla revestidos con un himenio.

En el himenio se desarrollan los basidios que al principio son células binucleadas que sufren un proceso de fusión nuclear y meiosis. Posteriormente se forman las basidiosporas que al madurar salen y son esparcidas por el viento y los insectos.

Chang y Hayes¹⁰ establecieron que en un medio adecuado la espora germina y se desarrolla hasta convertirse en una hifa homocariótica. La producción de las basidiosporas completa el ciclo de vida del hongo

2.4 Composición

Chang y Hayes¹¹, afirman que *L. edodes* posee un 90.0% de humedad, un 15.5% de proteína 6.5% de grasa, 7.7 % Fibra y 5.4 % de cenizas.

Datos reportados por Weil¹², muestran como en 100 gramos de Shiitake se encuentran entre 1-39 calorías, 15-35g proteínas, 7.3 g. carbohidratos, 0.8 g.

¹⁰ CHANG S. T and HAYES W. A. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic press. New York, San Francisco London. 1978.

¹¹ Ibid., p 5.

¹²WEIL A. Shiitake, Enoki: A Mushroom a Day, American Health, May, 1987, pp.129-134.

fibra, 0.8 mg. de tiamina 0.5 mg de riboflavina, 5.5 mg de niacina y vitaminas como vitamina D2, A, E, C, B1, B2, B6 y B12

2.5 Etapas de desarrollo del Shiitake

Según Vetchinkina et al,¹³ se han descrito cinco etapas de desarrollo del Shiitake de acuerdo con las características que presenta el hongo, como la coloración del micelio, la formación de una película sobre el sustrato, la aparición de los primordios y del cuerpo de fructificación

Las características de cada etapa de desarrollo de acuerdo con lo estipulado por Chen¹⁴ son:

Etapas 1. El crecimiento del micelio:

Después de la inoculación del sustrato con el Shiitake, el micelio blanquecino crece hasta colonizarlo. Esta es una fase de asimilación de nutrientes las enzimas están muy activas para romper los componentes del sustrato como, celulosa, hemicelulosa o lignina y transformarlas en moléculas más simples que puede ser absorbidas por el micelio para su crecimiento y propagación. Una semana antes de la fructificación la temperatura de los bloques formados con el sustrato donde se inoculo el Shiitake alcanza los 25-27 °C

Etapas 2. Formación del escudo del micelio:

Después de dos a cuatro semanas en la superficie exterior del bloque del sustrato se forma una capa gruesa de micelio que inicialmente es de color blanco. En esta etapa la concentración de CO₂ en el interior es alta.

Etapas 3. Formación de ampolla, o de palomitas de maíz:

En la mayoría de cepas los grupos de micelio se desarrollan formando ampollas, son bultos de diferentes tamaños que se aprecian en la superficie del sustrato. Esto normalmente comienza cuando la colonización del micelio blanco cubre todo el sustrato. Los primordios son producidos en las hendiduras que se forman, sin embargo, muchos son abortados y nunca se convierten en cuerpos fructíferos. El tiempo de formación de las protuberancias varía con las cepas, el sustrato y la temperatura,

¹³VETCHINKINA, E., NIKITINA, V., TSIVILEVA, O., GARIBOVA, L. Activity of *Lentinus edodes* intracellular lectins at various developmental stages of the fungus. Applied Biochemistry & Microbiology; Jan2008, Vol. 44 Issue 1, 2008. pp. 66-72, 7p, 3 1.

¹⁴CHEN, A. W. Cultivation of *Lentinula Edodes* on Synthetic Logs. The Mushroom Growers' Newsletter 10(4), 2001, pp. 3-9.

normalmente las protuberancias se forman a los 10 días, aparecen más rápido a 25 °C que a 15 °C.

Etapas 4. y 5. Browning y la formación de la corteza:

Esta es la etapa del oscurecimiento del micelio se torna rojizo y posteriormente cambia a un color marrón. El sustrato al interior se torna suave y húmedo como consecuencia del metabolismo del hongo. Esta etapa es ideal para el comienzo de la fructificación.

En esta etapa algunos productores como Oei¹⁵, aconsejan quitar toda la bolsa cuando se ha dorado un tercio a un medio de la capa de micelio, otros recomiendan la eliminación de las bolsas antes de la pigmentación, para que esta se produzca fuera de la bolsa.

El momento de la eliminación de la bolsa es crucial pues el mejor rendimiento del cultivo depende si este proceso no se realiza demasiado temprano o demasiado tarde

2.6 Cultivo Shiitake

El cultivo de hongos comestibles en América Latina ha ido en aumento en los últimos años, datos reportados por Martínez¹⁶, muestran que en el período comprendido entre 1995-2001, ha habido un aumento de la producción en un 32% para la región de América Latina, de 49.975 a 65.951 toneladas por año. El valor económico alcanzado ha superado los 167 millones de dólares por año. Dentro de los países más destacados en la producción de hongos comestibles se encuentra México con el 58,6%, Chile con el 17,6% y Brasil con el 10,6%, que representan el 86,8% del total de la producción de hongos comestibles

Según Chen¹⁷, el cultivo del Shiitake en América Latina tuvo su origen alrededor de la década de los 1980's en Guatemala, Colombia y México. En la actualidad, se cultiva también en países como Argentina y Brasil. En Colombia la producción en el año 2002 fue de 3.6 toneladas.

¹⁵ OEI. P. Mushrooms Cultivation. Tercera Edición. Backhuys Publishers. Leiden Holanda. 2003.

¹⁶ MARTÍNEZ CARRERA D. Current Development of Biotechnology In Latin Mushroom America. MICOL. APL. INT., 14(2). 2002, pp. 61-74.

¹⁷ CHEN, Op. Cit., p. 4.

2.7 Sustratos

Actualmente para reducir los costos y aumentar la producción se esta empleando el cultivo de Shiitake en bloques sintéticos para lo cual según Martínez¹⁸ se emplean diferentes sustratos sobre una base de aserrín de madera dura, complementado con otros materiales orgánicos como fuentes de nitrógeno, (salvado de arroz, salvado de trigo, centeno, avena y harina de trigo).

Chen¹⁹ afirma que el cultivo de Shiitake en bolsas con aserrín fue desarrollado en los años setentas en China, es un método que alcanza mayor productividad, facilita el manejo de los bloques durante la colonización del sustrato, facilita cumplir con la demanda del mercado y permite utilizar residuos agrícolas y sustratos gastados para generar alimentos

Un factor de gran importancia en el cultivo es la composición del sustrato, varios estudios evidencian como las características del sustrato influyen con una mejor producción y mejores características del Shiitake por ejemplo en el trabajo desarrollado por Royse y Bahler²⁰ evaluaron la eficiencia biológica y el tamaño de los hongos comestibles cultivados en formulaciones de diferentes sustratos y concluyeron que existen interacciones significativas entre genotipo del hongo, la formulación del sustrato y el tiempo de desarrollo del hongo.

Existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados en el cultivo de Shiitake entre ellos están el aserrín de eucalipto y el aserrín de amarillo. Según Brako y Zarucchi²¹, el eucalipto cuyo nombre científico es *Eucalyptus camaldulensis* Dehn es originario de Australia y se ha introducido en varias partes del mundo, su madera es rojiza, moderadamente densa (0,6 g/cm³) y moderadamente fuerte. Se utiliza en la fabricación de postes, tableros, interiores, pisos, y algunas veces para la fabricación de pulpa y papel.

¹⁸ MARTÍNEZ, Op. Cit., p. 7.

¹⁹ CHEN, 2005, Op. Cit., p. 4.

²⁰ ROYSE, D. J. and BAHLER, C. C. Effects of genotype, spawn run time, and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. Appl. Environ. Microbiol, 52, 1986, pp.1425-1427.

²¹ BRAKO, L. y ZARUCCHI, J. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden, 1993.

El amarillo cuyo nombre científico es *Tabebuia ochracea* según la OET²². es originario de América Tropical, se distribuye desde América Central hasta Colombia, Venezuela, Brasil y Trinidad., es una especie común en bosques secos y deciduos o semi-deciduos, su madera es pesada y dura se utiliza en la construcción en general, en la fabricación de muebles, para combatir la erosión de suelos y para la regeneración natural en potreros abandonados.

2.8 Condiciones de cultivo

Según los datos brindados por la planta Bogotana productora de shiitake en la cual se realizó este estudio, el cultivo comienza con la recepción de materias primas para la elaboración de los bloques sintéticos donde es sembrado el Shiitake. Estas materias primas se mezclan de acuerdo a la fórmula utilizada por cada productor esto se hace en condiciones ambientales de temperatura luz y humedad. Luego se esteriliza el sustrato previamente empacado en bolsas de polipropileno a 121 °C y dos psi de presión por aproximadamente 2 horas.

Se le hace limpieza al cuarto donde se hace la inoculación de la semilla del Shiitake, aplicando soluciones de hipoclorito de sodio, formol o en su defecto ácido peracético. Además se somete el lugar a la exposición a la luz ultravioleta por espacio de 3 horas como mínimo, para inactivar las esporas presentes en el ambiente, las cuales son vectores de contaminación de este tipo de cultivos. Se pasan los bloques esterilizados al cuarto de inoculación y se siembra el Shiitake.

Posteriormente se pasan los bloques a los cuartos de crecimiento para que se puedan desarrollar, en la tabla 1 se muestra las condiciones que se aplican, en cada una de las etapas de desarrollo. En las tres primeras etapas, los bloques artificiales son incubados, en un cuarto oscuro con el 50% a 60% de humedad a 25°C, manteniéndolos en condiciones de asepsia.

²² OET. Especies nativas y exóticas para la reforestación en la zona sur de Costa Rica. Memoria del II Encuentro sobre Especies Forestales (eds. D. Nichols & E Gonzalez).OET, Costa Rica. 1991, pp. 21-327.

Tabla 1. Condiciones ambientales para el cultivo de Shiitake en las diferentes etapas de desarrollo. Datos obtenidos de la planta Bogotana productora de Shiitake.

CONDICIONES DE CULTIVO	ETAPAS DE DESARROLLO			
	Micelio	Escudo	Ampolla	Browning y Fructificación
Duración	90 - 120 días	90 - 120 días	90 - 120 días	3-30 días
Humedad	50%-60%	50%-60%	50%-60%	85%-95%
Temperatura	25°C	25°C	25°C	13°C-20°C
Luminosidad	No	No	No	Si
Aireación	Si	Si	Si	Si
Asepsia	Máxima posible	Máxima posible	Máxima posible	Máxima posible
Otros	Revisión sistemática de contaminación y condiciones ambientales	Revisión sistemática de contaminación y condiciones ambientales	Revisión sistemática de contaminación y condiciones ambientales	Revisión sistemática de contaminación y condiciones ambientales

Posterior a la etapa de ampolla se sumergen por 8 horas en agua fría, generando así un choque térmico, baja la temperatura de los bloques 10°C la humedad es del 100% y no hay luminosidad se aplica la máxima asepsia posible

Después de la inmersión, los bloques son trasladados a otro cuarto con un mayor grado de humedad entre el 85 al 95%, en presencia luz y una temperatura de temperatura de 13°C a 20°C, donde permanecen de 3 a 30 días desarrollándose las etapas de brownig y fructificación

2.9 Contaminación en el cultivo de Shiitake

La contaminación es uno de los problemas principales en el cultivo de *L. edodes*, según lo reportado por Pukahuta et al²³ se ha estudiado principalmente la generada por hongos entre los que se encuentran los géneros *Trichoderma*, *Catenulatum*, *Penicillium* y *Aspergillus*, Badham²⁴ reportó que las especies causantes de los mayores daños al Shiitake pertenecen al genero *Trichoderma*, varios trabajos referentes a la contaminación del cultivo de Shiitake se han centrado principalmente en este género por ser su principal competidor.

²³ PUKAHUTA C., LIMTONG S., SUWANARIT P. and NUTALAYA S. Species Diversity of *Trichoderma* Contaminating Shiitake Production. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 34, 2000, pp. 478 – 485.

²⁴ BADHAM, E.R. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. Mycologia 83, 1991, pp. 455-463.

En trabajos de Savoie y Mata²⁵ se observó como las especies de *L. edodes* y *Trichoderma spp.*, presentan mutua competencia por el espacio y los nutrientes y reacciona ante su interacción con respuestas químicas como la producción de antibióticos y enzimas extracelulares Tokimoto y Komatsu²⁶, reportaron diferentes especies de *Trichoderma*, como *T. viride*, *T. harzianum* y *T. polysporum*, que causa lesiones en el crecimiento del micelio y en el cuerpo fructífero de *L. edodes*.

Por su parte, *L. edodes* ofrece respuestas de defensa ante la presencia de los microorganismos que lo afectan o compiten con él. Jong y Birmingham²⁷, reportaron compuestos que producen respuestas inhibitorias para una gran gama de microorganismos que pueden jugar un papel importante en la defensa contra los competidores

Hatvani et al²⁸ afirman que *L. edodes*, produce enzimas ligninolíticas importantes para degradar las moléculas de lignina como defensa contra *Trichoderma spp.*, se ha observado que estos dos hongos, aumentan sus niveles de enzimas extracelulares cuando están interactuando. Así mismo se ha registrado en algunos trabajos, que las respuestas de defensa de *L. edodes* frente a los ataques de *Trichoderma spp.*, pueden aumentar según el sustrato en donde crece.

En el estudio realizado por Tokimoto y Komatsu²⁹, también se evidenció que la composición de los medios de cultivo donde creció *L. edodes* y se inoculó *Trichoderma spp.*, afectó el antagonismo entre estas especies, pues los medios de cultivo ricos en fuente de nitrógeno favorecieron el ataque *Trichoderma spp.*, mientras que en los medios de cultivo que contenían glucosa, manosa y almidón, se controló el ataque. De lo anterior concluyeron que se logra una reducción en el daño causado por este microorganismo mediante el control del estado nutricional de *L. edodes*

²⁵ SAVOIE J. and MATA G. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. Mycologia, 95(2), 2003, pp. 191–199.

²⁶ TOKIMOTO K, KOMATSU M. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. Ann Phytopath Soc Japan 45, 1979, pp.261–264.

²⁷ JONG S. and BIRMINGHAM J. Medicinal and Therapeutic value of the Shiitake mushroom Adv. Appl. Micro. 39. 1993, pp.153-184.

²⁸ HATVANI N. KREDICS L, Z. ANTAL Z. and MECS I. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. Journal of Applied Microbiology, 92, 2002, pp.415-423.

²⁹ TOKIMOTO K, and KOMATSU M, Op. Cit., p. 11.

Savoie, Mata y Delpech ³⁰ reportaron que la modificación de la composición de los sustratos utilizados para el crecimiento del inóculo de *L. edodes* puede mejorar la capacidad de respuesta a la competencia hecha por *Trichoderma spp.*, una de las causas es la adición de componentes ricos en lignina y fenoles, que actúan como inductores de lacasas y del sistema de defensa global del hongo.

Las especies de *Trichoderma spp.*, de acuerdo a lo dicho por Klein y Eveleigh³¹, son cosmopolitas y típicas del suelo algunas prefieren localidades secas, templadas o frías. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos. Se encuentran diferentes especies y cepas en el cultivo de hongos comestibles, algunas son inofensivas y otras muy dañinas, por lo que su relación antagónica con los hongos cultivados todavía no está completamente conocida y varía entre especies y cepas.

FAN et al³² reportaron varios hongos contaminantes del cultivo de Shiitake como:

- ❖ *T. viride*: presenta un micelio blanco denso seguido por una esporulación verde, se difunde rápidamente formando parches grandes, y no permite la colonización del micelio del Shiitake. Hacia el borde de los parches, el micelio de shiitake va tomando un color marrón y se produce la lisis de los cuerpos fructíferos en su fase inicial, lo cual sugiere una degradación enzimática. Después de la infección por *T. viride*, los cuerpos de fructificación del Shiitake se vuelven blancos y generan un líquido negro. Se ha demostrado que se produce un colapso en el micelio del Shiitake y desorganización celular. La infestación por *T. viride* se produce principalmente por el ingreso a los cuartos de cultivo de sustrato gastado, por personal y equipo contaminados, por la mala esterilización del sustrato y por la transferencia de bolsas entre los cuartos de cultivo sin una higiene adecuada.

³⁰ SAVOIE G, MATA JM, and DELPECH P. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in presence of lignin derivatives in solid media. *Mater Organismen* 31, 1997, pp. 109–122, citado por SAVOIE J and MATA G. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia*, 95(2), 2003, pp. 191–199.

³¹ KLEIN D, EVELEIGH DE. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, eds. *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. London, UK, 1998, pp 57–74.

³²FAN L, PAN, WU y KWON H. Manejo de pestes y Enfermedades en el cultivo de Shiitake en bolsa. *Shiitake Mushroom Cultivation, Growers Handbook 2: Part I. Shiitake*, Cap 5: Manejo de plagas y enfermedades del Shiitake. 2005. [en línea] URL: <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/shiitake/capitulo%205%20pag.202-209.pdf> (Consultado sep 2010).

- ❖ *Neurospora sitophila* y *Neurospora crassa*: Presenta un micelio de color blanco seguido por una esporulación roja o anaranjada que se transportan por el aire diseminándose rápidamente, puede llegar a producir malformaciones de los primordios del Shiitake. Se presenta principalmente en sustratos mal esterilizados o con alta humedad.

- ❖ *Penicillium spp*: varias especies de *Penicillium* se han encontrado siendo contaminantes del cultivo de Shiitake entre ellas están: *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. pallidum*, *P. digitatum* y *P. italicum*. Los síntomas iniciales *Penicillium* se parecen a los producidos por *Trichoderma spp*, pero su micelio se difunde más lentamente. El micelio del *Penicillium spp*, es blanco y posteriormente aparece una extensa esporulación azul. Este hongo se presenta preferiblemente en los sustratos ácidos.

- ❖ *Mucor spp*: Se caracterizan por la presencia de colonias algodonosas y espesas de rápido crecimiento. Posee esporangióforos verticales que son blancos al principio y posteriormente se tornan de color gris aceituna a marrón. Sus esporas son parduscas. Se puede encontrar en la tierra, el aire, el estiércol, la paja vieja y el compost. Este hongo crece más rápidamente que el micelio del shiitake por lo que puede ganarle espacio y ocupar el sustrato, impidiendo el crecimiento del micelio de shiitake y causando su amarillamiento.

- ❖ *Aspergillus spp*: Son hongos caracterizados por tener conidióforos que terminan en una vesícula hinchada, con fiálides en forma de frasco. Presentan una colonia blanca gruesa que con el tiempo toma un color amarillo verdoso. Está presente en la tierra, el aire y los residuos orgánicos. La aparición en los cultivos de Shiitake se puede producir por el alto grado de humedad y una mala ventilación de los cuartos de cultivo.

3. PROBLEMA

Lentinula edodes es un hongo comestible promisorio por su uso en el mercado de los alimentos, la industria y por su potencial medicinal. Para su cultivo se utilizan bloques sintéticos formados con residuos agroforestales o residuos agrícolas complementados con algunos suplementos como salvado de trigo o cascarilla de arroz y sustancias que den forma a los bloques sintéticos como el yeso, estas materias primas se mezclan en condiciones ambientales de temperatura luz y humedad y luego se esterilizan para empacarlas en bolsas de polipropileno. Posteriormente para su desarrollo se ubican los bloques sintéticos en cuartos donde se hace la inoculación de la semilla del Shiitake, con la máxima asepsia posible aplicando soluciones como hipoclorito de sodio, formol o en su defecto ácido peracético y además el lugar de siembra se somete a la exposición a la luz ultravioleta por espacio de 3 horas como mínimo, para inactivar las esporas presentes en el ambiente. Todos estos procesos se realizan para evitar posibles vectores de contaminación de este tipo de cultivos, pues el micelio del Shiitake es muy sensible a los contaminantes los cuales afectan el desarrollo de este hongo y con ello su producción.

Sin embargo a pesar de las medidas que se toman todavía se presenta un grave problema de contaminación en los cultivos de Shiitake que ya llegado a causar grandes pérdidas en los cultivos de este producto. Los microorganismos contaminantes de los sustratos pueden afectar entre otros el crecimiento, el desarrollo y calidad del Shiitake. Por esto es necesario realizar estudios encaminados a mejorar las condiciones de cultivo y así mismo conocer con mejor detalle los microorganismos contaminantes con el fin de implementar estrategias que ayuden a controlarlos y reducir las pérdidas en el cultivo.

4. JUSTIFICACIÓN

Lentinula edodes es un hongo comestible proveniente de las regiones montañosas de China, OEI³³. Afirman que su consumo ha aumentado en los últimos años, llegando a ser el tercer hongo cultivado en el mundo. Según Chimara,³⁴ este hongo posee propiedades alimenticias importantes, es rico en vitaminas y bajo en colesterol, posee propiedades medicinales como agente anti-cáncer, tiene efectos anti infecciosos y ayuda a reducir la presión arterial y el colesterol entre otros.

Pero el cultivo de este hongo presenta problemas de contaminación que ha generado grandes pérdidas en la industria ejemplo de ellos se tienen datos reportados por Romero et al³⁵ quienes afirman que en 2004 un grupo de investigadores del Colegio de Postgraduados en México detectó la presencia de cepas agresivas mico-parásitas de *Trichoderma. aggressivum* en muestras de sustrato contaminado, proporcionado por la principal planta de producción de Hongos, México S.A. Esta empresa, cuyos volúmenes de producción de champiñones ascienden a 55 toneladas por día, ha llegado a tener disminuciones hasta del 50% en su producción y pérdidas económicas millonarias debido al ataque de esta especie

Seaby³⁶ ha catalogado a *T. aggressivum* como el causante de una infección recurrente, en cultivos comerciales de *Agaricus bisporus* alrededor del mundo, sobre todo en Europa, Norteamérica, Asia y Latinoamérica.

Los hongos comestibles cultivados, le dan un valor y productividad a los desechos agrícolas, forestales y agroindustriales, al transformar estos residuos en proteínas, vitaminas y aminoácidos, esenciales para la vida humana y animal García³⁷ muestra como la producción de hongos comestibles se realiza varios países como China, Japón, Taiwán, Filipinas, Francia, Inglaterra, España, Alemania, y Estados Unidos En Colombia aunque su cultivo no es numeroso han ido creciendo con los años, según Martínez³⁸ en Colombia de 100 toneladas producidas en el año 1970 se pasó a producir 3520 en el año 2001 y se proyecta como un buen producto en el mercado.

³³ OEI, Op. Cit., p. 7.

³⁴ CHIMARA, G. Op. Cit., p. 1.

³⁵ ROMERO O., HUERTA M., DAMIÁN M., DOMÍNGUEZ F y ARELLANO D. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI N° 2 Diciembre 2009. 143- 151. [en línea] URL: www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/articulo/.../12297 consultado septiembre de 2010. (Consultado oct. 2010).

³⁶ SEABY, Op. Cit., p. 2

³⁷ GARCÍA, Op. Cit., p. 1

³⁸ MARTÍNEZ, Op. Cit., p. 7.

Según lo reportado por Montoya y Hernández³⁹, en Colombia se han estado promoviendo el uso de los residuos orgánicos generados en diferentes cultivos, para servir como sustrato en los cultivo de Shiitake.

Sin embargo, existen algunas dificultades de orden tecnológico como la obtención sustratos que permitan mayor productividad y la reducción de la contaminación del cultivo. Es por ello que se plantea el siguiente proyecto de investigación en el cual caracteriza la microbiota patógena relacionada con cultivo de *Lentinula edodes* en diferentes residuos agroforestales y se aportan elementos para el conocimiento de la contaminación causada por estos microorganismos que sirvan a futuro para reducir las perdidas en los cultivos de Shiitake.

³⁹ MONTOYA B S. HERNÁNDEZ H. F. Importancia de la cadena productiva del hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) para fomentar su cultivo. Vector, Volumen 1, No. 1 Enero - Diciembre 2006, pp. 63 – 68.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la microbiota contaminante relacionada con cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake) en diferentes residuos agroforestales.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la microbiota que afecta a *L. edodes* en sus diferentes etapas de desarrollo.
2. Caracterizar la microbiota que afecta el cultivo de *L. edodes* en diferentes sustratos agroforestales.
3. Analizar la relación entre el sustrato utilizado y los contaminantes presentes en este.

6. METODOLOGÍA

La guía general para alcanzar los objetivos propuestos se resume en las figuras 2, 3 y 4.

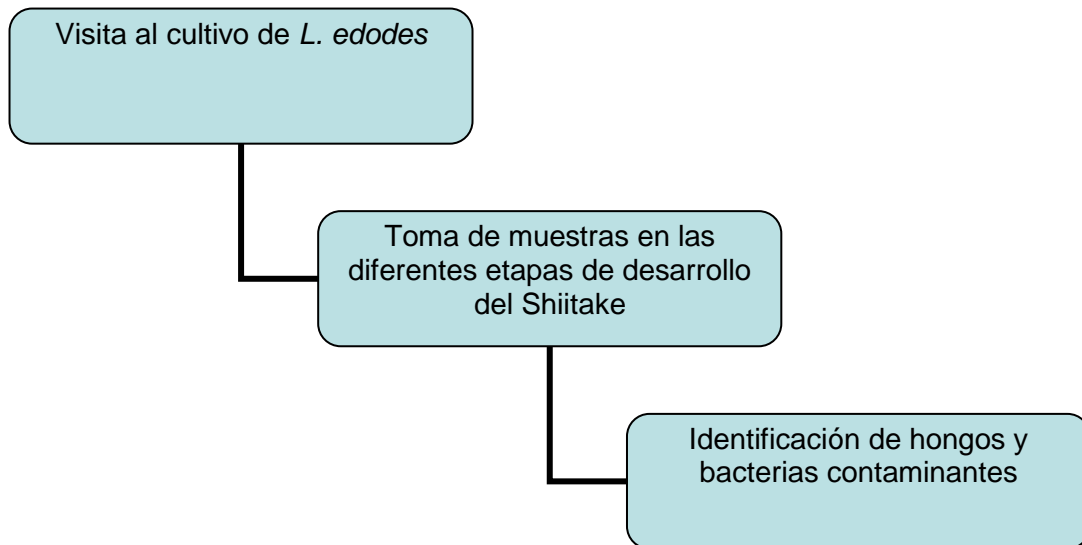


Figura 2: Resumen de la metodología utilizada en el objetivo 1

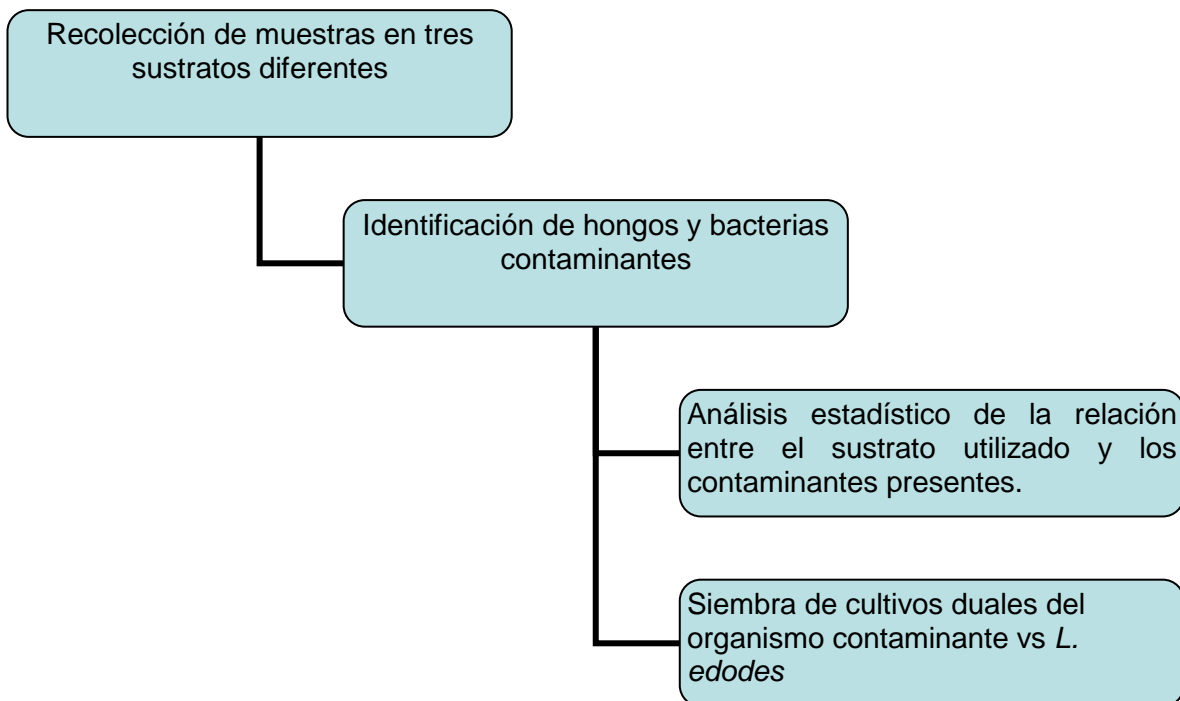


Figura 3: Resumen de la metodología utilizada en el objetivo 2

6.1 Diseño experimental

Se obtuvieron muestras de *L. edodes* en dos empresas cultivadoras, una Bogotana en la cual se trabajaron dos sustratos aserrín de eucalipto con salvado de trigo y aserrín de amarillo con salvado de trigo y en una empresa del Salto del Tequendama en donde se trabajo el sustrato aserrín de eucalipto con cascarilla de arroz, como lo indica la figura 4.

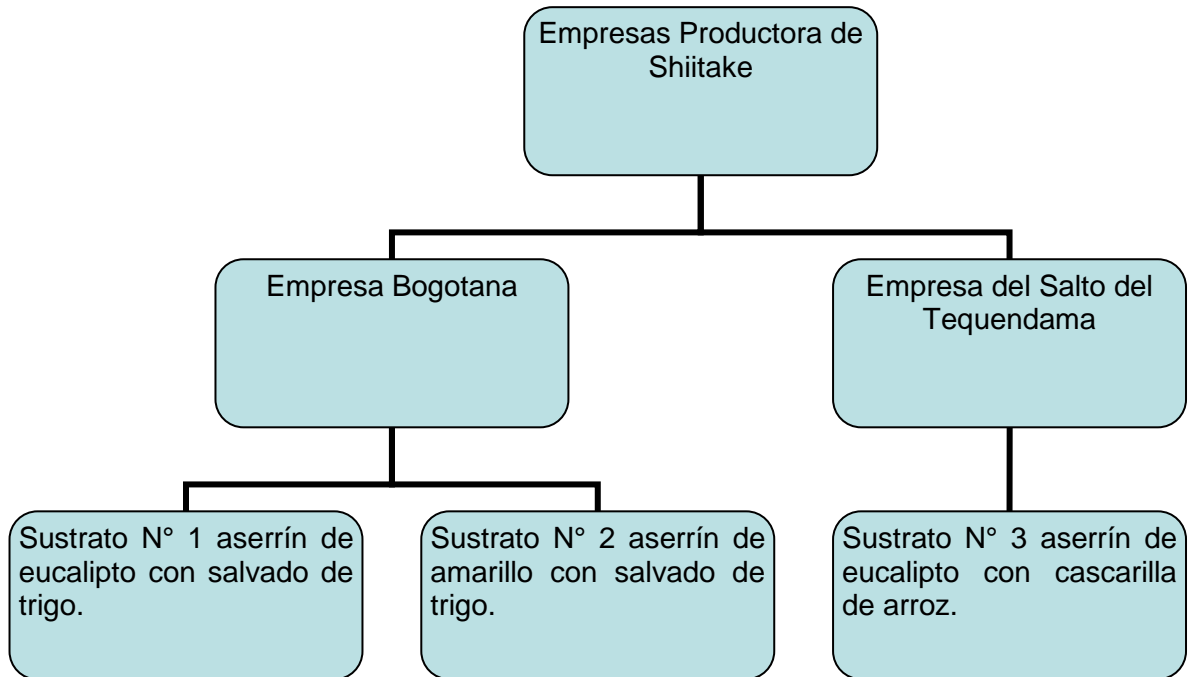


Figura 4: diagrama del diseño experimental.

En cada uno de los sustratos, se tomaron 24 muestras de la siguiente manera: se seleccionaron bloques sintéticos donde se cultivo el Shiitake y se clasificaron de acuerdo a las etapas de desarrollo, micelio, escudo, ampolla y browning y fructificación (que se trabajaron como una sola etapa por tan estrechamente relacionadas).

Se escogió al azar tres bloques sintéticos de cada etapa de desarrollo y de cada uno se tomaron dos muestras una en la superficie y otra a 5cm de profundidad, para abarcar tanto los organismos contaminantes de la superficie como los que están dentro del sustrato.

6.2 Identificación de hongos contaminantes:

Las muestras para la determinación de hongos contaminantes, se colocaron en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), según la metodología planteada por Rivera⁴⁰, se incubaron a 25 °C por 20 días y se realizaron observaciones diarias.

A partir de estos cultivos se realizaron sub-cultivos para aislar los hongos contaminantes que crecieron en las cajas de petri. Después se realizó la identificación morfológica de los hongos aislados por análisis microscópico y claves específicas para cada género.

Los aislados de *Trichoderma spp* se identificaron a nivel de especie, con una clave taxonómica del género *Trichoderma* de Samuels et al⁴¹ y el programa de medidas Piximetre un software que permite establecer las dimensiones características de una población de objetos a partir de una muestra representativa y que ha sido utilizado para establecer mediciones en estudios de hongos.

Los aislados de *Penicillium spp* se cultivaron en agar Czapek un medio especializado para el estudio de estos hongos.

Se analizaron las especies de hongos encontradas de acuerdo a claves taxonómicas específicas de cada género.

6.3. Identificación de bacterias contaminantes:

Las muestras para el análisis de las bacterias se colocaron en cajas de petri con Agar Nutritivo (AN) de acuerdo a lo establecido por Rivera⁴². Se realizaron sub-cultivos para aislar las bacterias a identificar y se les realizó frotis teñido por coloración Gram.

Posteriormente se mandó al laboratorio bioquímico Ltad., para la realización de las pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa, entre otras y la identificación de género y especie con el programa @BBL CRYSTAL.

⁴⁰ RIVERA V. Identificación y caracterización de hongos y bacterias asociados con la pudrición del cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado Académico de Licenciatura. Zamorano. Honduras Diciembre. 2007.

⁴¹ SAMUELS, GJ, CHAVERRI, P., FARR, DF, Y MCCRAY, EB. *Trichoderma*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. 2010.. [on line] URL: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (Consulted oct. 2010).

⁴² RIVERA V. Op. Cit., p. 20

6.4 Evaluación de especies contaminantes antagónicas

Para el antagonismo se realizaron pruebas *in vitro* siguiendo el método del cultivo dual utilizando por De Mello et al⁴³ PDA para los hongos y AN para las bacterias.

Se realizaron tres replicas para cada una de las especies encontradas. Se incubaron a 25°C y se registro la formación de una zona de demarcación entre los inóculos, el grado de crecimiento del organismo contaminante con relación al espacio ocupado en la caja de petri y los cambios físicos observados al microscopio en el micelio del Shiitake.

6.5 Análisis de los contaminantes por sustrato:

Para analizar la relación entre el sustrato empleado y las especies contaminantes en el cultivo de *L. edodes*, se realizo un análisis de correspondencias simples entre los hongos o bacterias caracterizados y los sustratos en que se reportaron, la prueba estadística se baso en una estadística Chi-cuadrado con $(k-1)(n-1)$ grados de libertad siendo k el número de categorías fila es decir el número de especies de contaminantes y n el número de categorías columna, es decir el número de sustratos donde se encontraron los organismos contaminantes.

La suma de las inercias, que depende exclusivamente de los datos se multiplicó por el total de observaciones. Con un nivel de confianza del 99% para rechazar la hipótesis nula de independencia entre las especies de contaminantes y el sustrato donde fueron tomadas las muestras.

⁴³ DE MELLO S. AVILA Z, BRAÚNA L. y PÁDUA R. Selección de aislados de *trichoderma* spp. Para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Brasilia, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnología, 170, 2007 pp. 1340-1676.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Hongos contaminantes en las diferentes etapas de desarrollo

Fueron encontradas las mismas especies de hongos en las muestras tomadas en la superficie y a 5 cm de profundidad. No hubo incidencia del factor profundidad por lo cual estadísticamente no se tomó como un factor de separación de las muestras.

En el sustrato de eucalipto-salvado de trigo-Bogotá (gráfica 1), en las etapas de micelio y ampolla, se encontraron las especies *T. aggressivum* en dos de las muestras y *T. crassum* en cuatro de las muestras. Estas especies se hallaron también en la etapa de browning y fructificación en proporción inversa: *T. aggressivum* en cuatro muestras y *T. crassum* en dos muestras.

Según Savoie et al⁴⁴ la especie *T. aggressivum* ha sido caracterizada como una de las especies que afecta el cultivo de *L. edodes* así como de otros hongos comestibles como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus*. Romero et al,⁴⁵ afirman que esta especie está relacionada con la epidemia de moho verde en hongos comerciales.

No ha sido reportada la incidencia de *T. crassum* en cultivos de Shiitake, pero se sabe que afecta el crecimiento de otros hongos. Ah Chee⁴⁶ registró un potencial antagonismo de *T. crassum* en ensayos de actividad biológica contra *Phlebiopsis gigantea*, un hongo que causa daño a las raíces de los árboles de coníferas en el hemisferio norte y además observó la presencia de antibiosis y mico parasitismo.

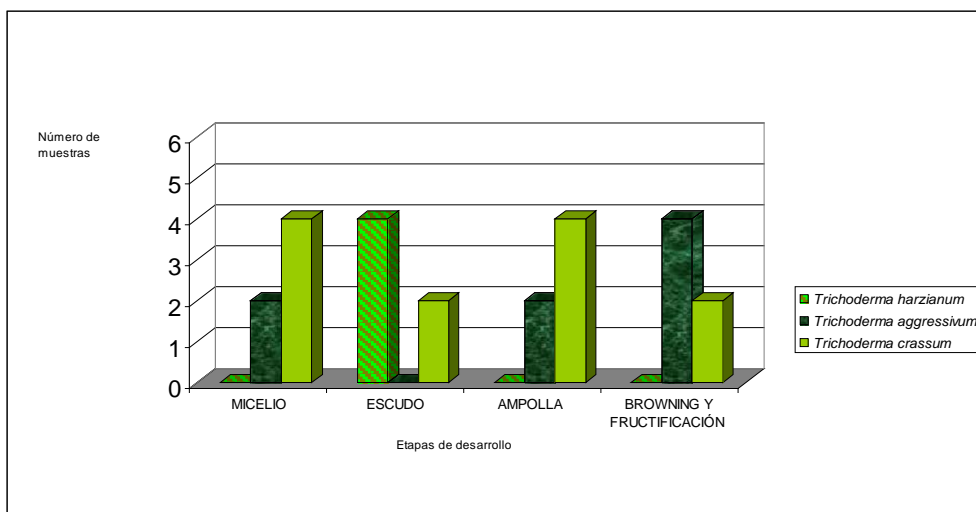
En la etapa de escudo se encontraron las especies *T. crassum* en 2 de las muestras y *T. harzianum* en 4 muestras. Fletcher et al⁴⁷ reporta que esta última especie es un patógeno del cultivo de hongos comestibles.

⁴⁴ SAVOIE J. MATA G. and MAMOUN M. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot basidiomycetes and *Trichoderma harzianum* biotype Th2. *Mycologia* 93: 2001, pp. 243–248.

⁴⁵ ROMERO, O. et al, Op. Cit., p. 14

⁴⁶ AH. CHEE, A. Basidiomycete wood decay fungi from *Pinus radiata*: biology and biological control. Thesis, Doctor of Philosophy. Lincoln University 2001. [on line] URL: <http://researcharchive.lincoln.ac.nz/dspace/handle/10182/1893> (Consulted sept. 2010).

⁴⁷ Fletcher, J. WHITE F and R. GAZE H. Champiñones: control de las enfermedades y plagas. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1986, 159 pp



Gráfica 1: Frecuencias de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto- salvado de trigo (Bogotá).

Estos resultados evidencian la presencia de la especie *T. crassum* en todas las etapas de desarrollo y su mayor incidencia en las etapas de micelio y ampolla.

T. aggressivum se presentó en tres de las etapas analizadas. Este hongo se encontró en un mayor número de muestras en la etapa de browning y fructificación; probablemente por ser la especie más agresiva y resistente de las tres encontradas que aprovechó mejor el cambio de las condiciones ambientales y se extendió en un mayor número de muestras.

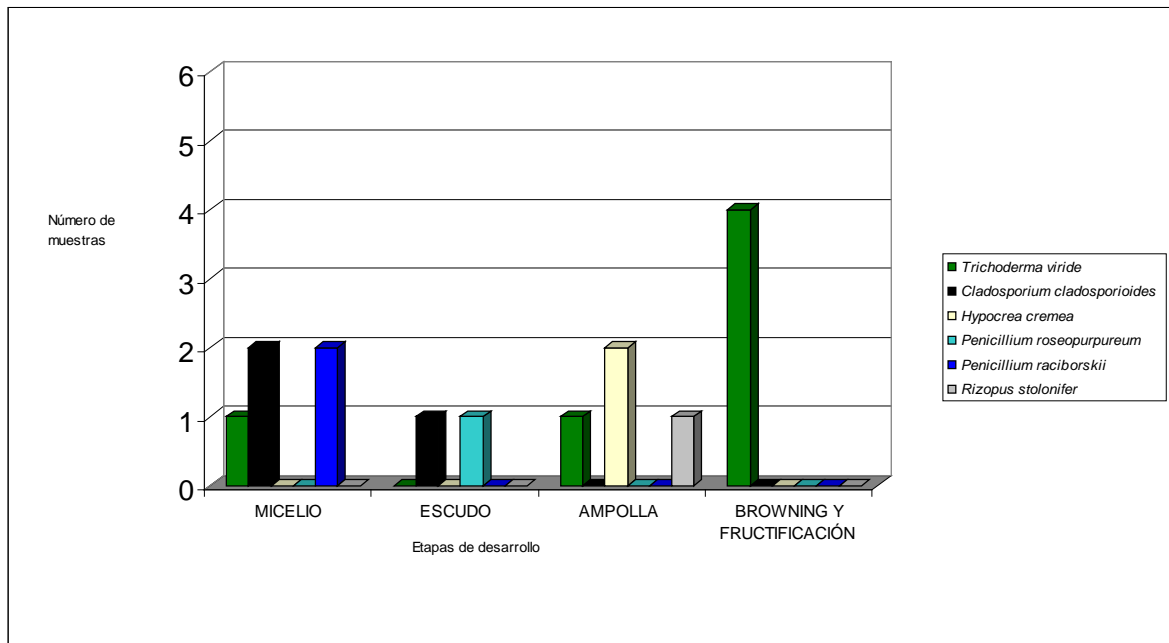
En el sustrato de eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama (gráfica 2) se encontraron en la etapa de micelio las especies *T. viride* en una de las muestras, *Cladosporium cladosporoides* en dos de las muestras y *Penicillium raciborskii* en dos de las muestras.

T. viride según FAN L, PAN, WU y KWON H⁴⁸, ha sido reportada entre las especies que atacan el cultivo en bolsa y la semilla del shiitake. Así mismo, según NICODERMA⁴⁹, ha sido observado su antagonismo hacia otros hongos como *Rizhoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* y *fusarium spp* que causan enfermedades a las semillas y suelos en los cultivos de importancia económica.

⁴⁸FAN L, PAN, WU y KWON H ROMERO, Op. Cit., p. 12

⁴⁹NICODERMA. 2010. http://www.neemnico.com/spanish/Nicoderma_Spanish.pdf (Consulted sep. 2010).

Cladosporium cladosporoides, según Domsch et al⁵⁰ posee una capacidad limitada como parásito y su patogenicidad no está totalmente dilucidada. *Penicillium raciborskii* de acuerdo con Piontelli et al⁵¹ es una especie con versatilidad nutricional a lo cual puede deberse su presencia en el sustrato.



Gráfica 2: Frecuencia de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto- cascarilla de arroz (Salto del Tequendama).

En la etapa de escudo se encontró por segunda vez la especie *C. cladosporoides* y se observó por primera vez la especie *P. roseopurpureum* en dos muestras cada una.

En un trabajo realizado por Torrenegra⁵² se identificó que *P. roseopurpureum* posee capacidades antifúngicas. Se ha demostrado que esta especie produce metabolitos frente a *Fusarium oxysporum*. Esta actividad también la podría estar presentando frente al Shiitake.

⁵⁰ DOMSCH K. GAMS W. & TRAUTE-HEIDE A. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, UK. 1980, 809 p.

⁵¹ PIONTELLI E, GIUSIANO G, y VIVAR V. Distribución Altitudinal de Hongos Queratinofilos, Epifitos y Endofitos en Suelos Desérticos del Norte Chileno (II Región, 23°L.S Y 68°L.W). Boletín Micológico vol. 17, 2002 pp.33 – 49.

⁵² TORRENEGRA R, GARCIA L. Obtención de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa colombiana, de *Penicillium sp* sg 91. y evaluación de su actividad antimicrobiana. Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. Memorias del XVIII Congreso Italo-latinoamericano de etnomedicina “Juan Tomás Roig Mesa” 14 al 18 de septiembre de 2009, Ciudad de La Habana, Cuba.

En la etapa de ampolla se reportaron las especies *Rizopus stolonifer* en una de las muestras, *Hypocrea cremea* en dos de las muestras y *T. viride* en una de las muestras. Como se mencionó anteriormente, de estas tres especies, *T. viride* ya había sido reportada entre las especies que atacan la semilla y el cultivo de Shiitake en bolsa. *Hypocrea cremea* y *Rizopus stolonifer* no se encontraron registros de su influencia en cultivos de Shiitake.

En la etapa de browning y fructificación se encontró solamente la especie *T. viride* en cuatro muestras. Según estos resultados se aprecia que la especie *T. viride* esta presente en tres de las etapas y es la única especie en la etapa de browning y fructificación. Es probable, que la variación final en las condiciones del cultivo fuera aprovechada mejor por esta especie para establecerse sobre las demás especies contaminantes.

En el sustrato de amarillo- salvado de trigo-Bogotá (gráfica 3) se encontraron en la etapa de micelio las especies *T. harzianum* y *T. atroviride* en una muestra cada una y *Penicillium spinulosum* en tres muestras. *T. harzianum* como ya se explicó es una especie que afecta el cultivo de Shiitake; Romero et al.⁵³ afirman que esta especie ha sido la causante de varias pérdidas económicas en cultivos de hongos comestibles.

T. atroviride también ha sido descrito como agente causal de enfermedades en los cultivos de Shiitake. Según Chet e Inbar⁵⁴ esta especie es la responsable de la enfermedad del moho verde en los hongos comestibles. Ataca tanto el desarrollo del micelio como la fructificación y de acuerdo a Górski et al.⁵⁵, constituye una amenaza considerable a la producción de setas como *A. bisporus* y *Pleurotus spp.* Además *T. atroviride* es conocido por sus capacidades de control biológico contra una variedad de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*.

No se había registrado la presencia de *P. spinulosum* en el cultivo de Shiitake, lo más probable es que no sea patógeno para *L. edodes*, pues según expresan Pitt y Hocking⁵⁶, no se conocen micotoxinas producida por esta especie.

⁵³ ROMERO, O, Op. et al, Cit., p. 15

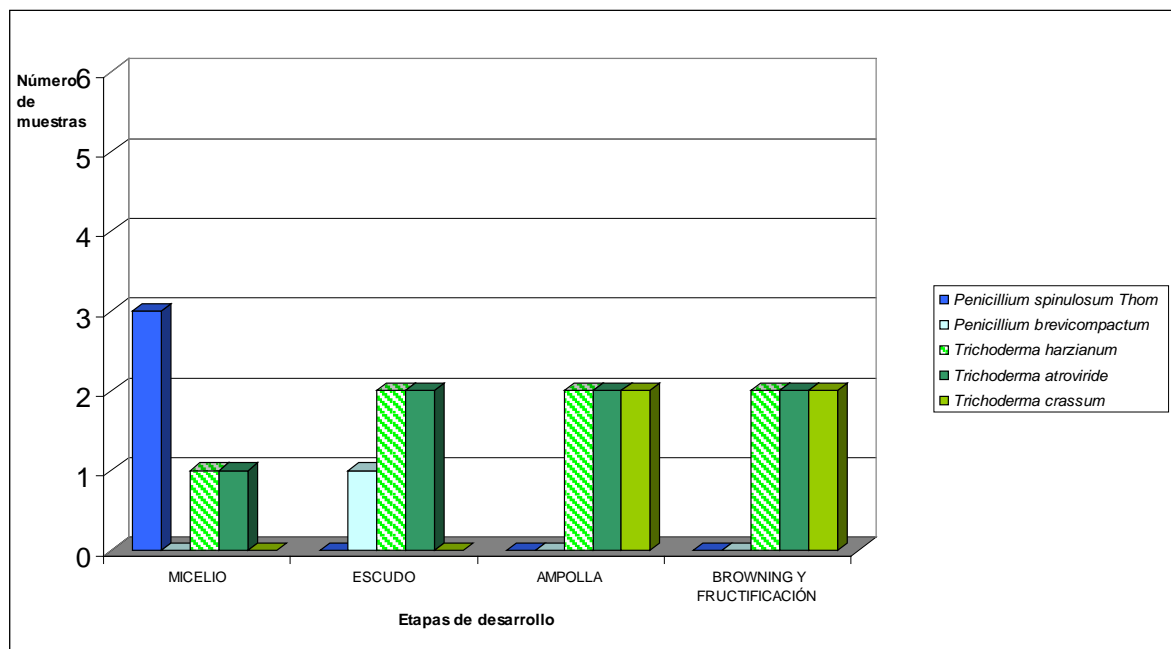
⁵⁴ CHET, I. e INBAR J. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48, 1994, pp. 37-43.

⁵⁵ GÓRSKI, R. FRUŻYŃSKA-JÓŻWIĄK, D. ANDRZEJAK, R. SOBIERALSKI K. AND SIWULSKI M. The Effect of Selected preparations *in vitro* growth of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride* found In garden mushroom (*Agaricus bisporus*) Crop. Phytopathol. Pol. 42: 2006, pp. 29–35

⁵⁶ PITT, J. and HOCKING A. 2009. Fungi and food spoilage, 3 ed springer science+business Media. New York. [on line] URL: <http://books.google.com.co/books?id=-B1s6GhOlzkC&pg=PA214&lpg=PA213&dq=Penicillium> (Consulted july. 2010).

En la etapa de escudo se encontró la especie *Penicillium brevicompactum* en una muestra y nuevamente las especies *T. harzianum* y *T. atroviride* en dos muestras. En un estudio realizado por Terashima et al ⁵⁷ se muestra como *P. brevicompactum* afecta el desarrollo del Shiitake. Estos investigadores Infectaron artificialmente varios cultivos de *L edodes* con *P. brevicompactum* obteniendo como resultado la alteración de la forma en los cuerpos fructíferos del Shiitake tornándose estos irregulares y poco valor comercial.

En las etapas de ampolla y browning y fructificación se encontraron nuevamente la presencia de las especies *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. crassum* en tres muestra cada una.



Gráfica 3: Frecuencias de hongos contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en amarillo-salvado de trigo (Bogotá).

En general, analizando los resultados obtenidos en los tres sustratos se puede observar que si hay influencia de la etapa de desarrollo con el tipo de especie de hongo contaminante presente, por ejemplo en los sustratos de amarillo-salvado de trigo-Bogotá y eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama hay presencia de especies de *Penicillium* en las etapas tempranas de desarrollo (micelio y escudo) mientras que en las últimas etapas predominó la presencia de especies de *Trichoderma*.

⁵⁷ TERASHIMA Y. IGUSA H. and OHGA S. Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates. Mycoscience vol 43, N° 3, 2002, pp. 277- 280.

Así mismo se puede observar como el cambio sufrido por el Shiitake en su última etapa de desarrollo puede favorecer la dominancia de una especie que presentaba baja frecuencia en las anteriores etapas, como es el caso del sustrato de eucalipto- salvado de trigo-Bogotá donde en esta etapa se fortaleció la presencia de *Trichoderma aggressivum* en el sustrato eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama se favoreció el crecimiento de *T. viride*.

La etapa de escudo presentó resultados interesantes, pues solo en esta etapa, en el sustrato de eucalipto- salvado de trigo -Bogotá se registró la presencia de la especie *Trichoderma harzianum* y no estuvo presente la especie *Trichoderma aggressivum* que si se registró en las otras tres etapas. En el sustrato de eucalipto- cascarilla de arroz-Salto del Tequendama ocurrió algo parecido solo en la etapa de escudo se registró la presencia de *P. roseopurpureum* y no estuvo presente *Trichoderma viride* que sí se registró en las otras tres etapas.

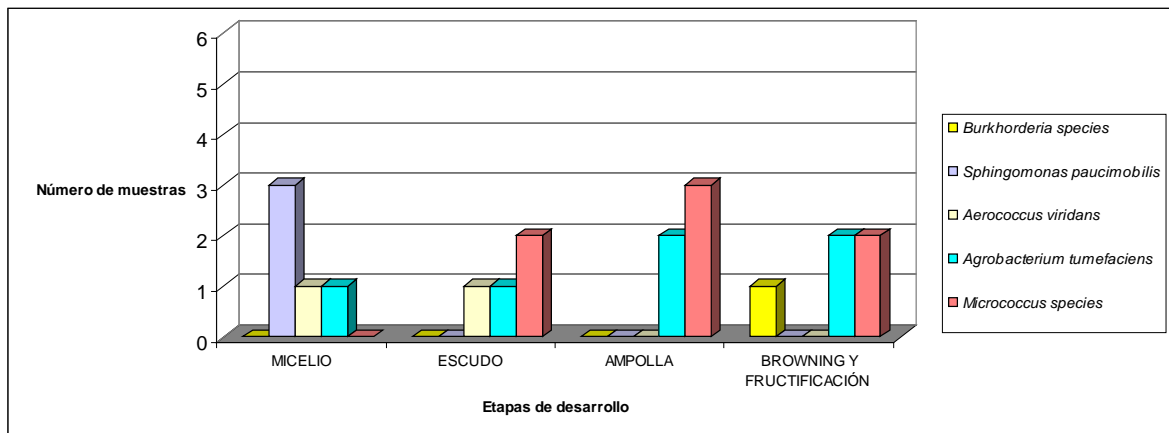
7.2 Bacterias contaminantes en las diferentes etapas de desarrollo

Fueron encontradas las mismas especies de bacterias en las muestras tomadas en la superficie y a 5 cm de profundidad. No hubo incidencia del factor profundidad por lo cual estadísticamente no se tomó como un factor de separación de las muestras.

En el sustrato de eucalipto-salvado de trigo-Bogotá, (gráfica 4) en la etapa de micelio se encontró la especie *Sphingomonas paucimobilis* en tres de las muestras y las especies *Aerococcus viridans* y *Agrobacterium tumefaciens* en una muestra cada una.

En la etapa de escudo se encontraron nuevamente las especies *A. viridans* y *A. tumefaciens* en una muestra cada una y se reportó además la presencia de *Micrococcus spp.* en dos de las muestras.

En la etapa de ampolla se encontró la especie *A. tumefaciens* en dos muestras y la especie *Micrococcus spp.* se presentó en 3 muestras. En la etapa de browning y fructificación se reportó nuevamente la presencia de las especies *A. tumefaciens* y *Micrococcus spp.* en dos de las muestras y la especie *Burkholderia spp.* en una de las muestras.



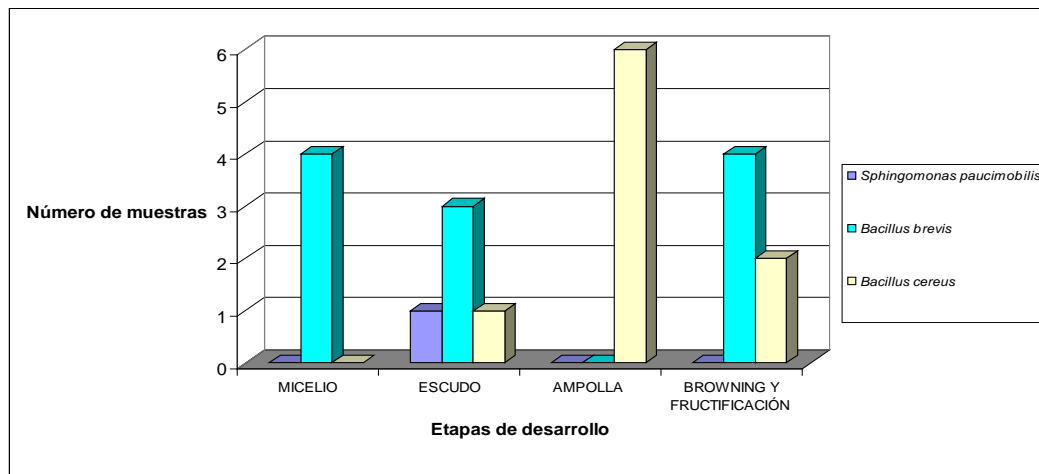
Gráfica 4: Frecuencias de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto-salvado de trigo (Bogotá).

Según estos resultados se pudo observar que la especie *A. tumefaciens* se encontró presente en todas las etapas de desarrollo en el sustrato eucalipto-salvado de trigo (Bogotá) y la especie *Micrococcus spp.* se presentó en tres de las cuatro etapas de desarrollo evaluadas.

Las especies halladas en este sustrato no habían sido reportadas asociadas a cultivos de Shiitake. De todas estas especies *Burkholderia spp.* ha demostrado poseer una capacidad antifúngica. Kang et al⁵⁸ afirma que posee un compuesto anti-hongos identificado con su nombre en inglés como 2-Hydroxymethyl-chroman-4-one el cual muestra una buena actividad contra fitopatógenos tales como *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

En el sustrato de eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama (gráfica 5) se encontró en la etapa de micelio, la especie *Bacillus brevis* en 4 de las muestras analizadas.

En la etapa de escudo se observaron las especies *Sphingomonas paucimobilis* y *Bacillus cereus* cada una en una muestra y la especie *Bacillus brevis* se observó en 3 muestras. En la etapa de ampolla se reportó la presencia de la especie *B. cereus* en todas las 6 muestras. Por último, en la etapa de browning y fructificación se encontró la especie *B. cereus* en dos muestras y la especie *B. brevis* en cuatro muestras. Según estos resultados *B. cereus* y *B. brevis* están presentes cada una en tres de las cuatro etapas.



Gráfica 5: Frecuencia de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en eucalipto-cascarilla de arroz (Salto del Tequendama).

De las tres especies de bacterias encontradas en este sustrato, *B. brevis* y *B. cereus* ya habían sido relacionadas con *L. edodes*. En un estudio realizado por Ishikawa et al⁵⁹ se observó actividad inhibitoria por parte de una cepa de

⁵⁸ KANG JG, SHIN SY, KIM MJ, BAJPAI V, MAHESHWARI DK, KANG SC. J. G. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by *Burkholderia sp.* MSSP. Antibiot J (Tokio). Nov; Vol. 57 N°11 2004, pp.726-31.

⁵⁹ ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M. Y VANETTI, M.C.D. Antibacterial Activity Of *Lentinula edodes* Grown In Liquid Medium. Braz. J. Microbiol. vol. 32, no. 3, 2001, pp. 206-210.

L. edodes obtenida en el Brasil frente a 35 cepas bacterianas evaluadas entre las que se encontraban estas dos especies.

En el sustrato de amarillo-salvado de trigo-Bogotá (gráfica 6), en la etapa de micelio se encontraron las especies *B. brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter aerogenes* en una muestra cada.

En las etapas de escudo y ampolla se reportaron las especies *K. oxytoca* y *E. aerogenes* en tres muestras. En la etapa de browning y fructificación se reportó la presencia nuevamente de las especies *K. oxytoca* y *E. aerogenes* en una muestra.

De las especies de bacterias encontradas en las diferentes etapas de desarrollo en este sustrato *B. brevis* mostró una relación antagónica con *L. edodes*; así mismo la especie *Stenotrophomonas maltophilia* ha mostrado ser antagónica de diferentes especies de hongos como lo reportó Kai et al⁶⁰ señalan a *Stenotrophomonas maltophilia* como un organismo antagonista de la especie *Rhizoctonia solanii*. Zhang y Yuen⁶¹ afirman que ésta especie es antagonista de la especie *Bipolaris sorokiniana* y Dunne et al⁶² demostraron que la cepa W81 de *Stenotrophomonas maltophilia*, aisladas de la rizosfera de remolacha azucarera produce las enzimas extracelulares quitinasa y proteasa que inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos como *Pythium ultimum*.

La especie *Enterobacter aerogenes* ha mostrado también capacidades antagónicas hacia la especie *Phytophthora cactorum*. Según Chernin et al⁶³, la cepa B8 de esta especie reduce significativamente las infecciones de la corona de manzana y pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cactorum*.

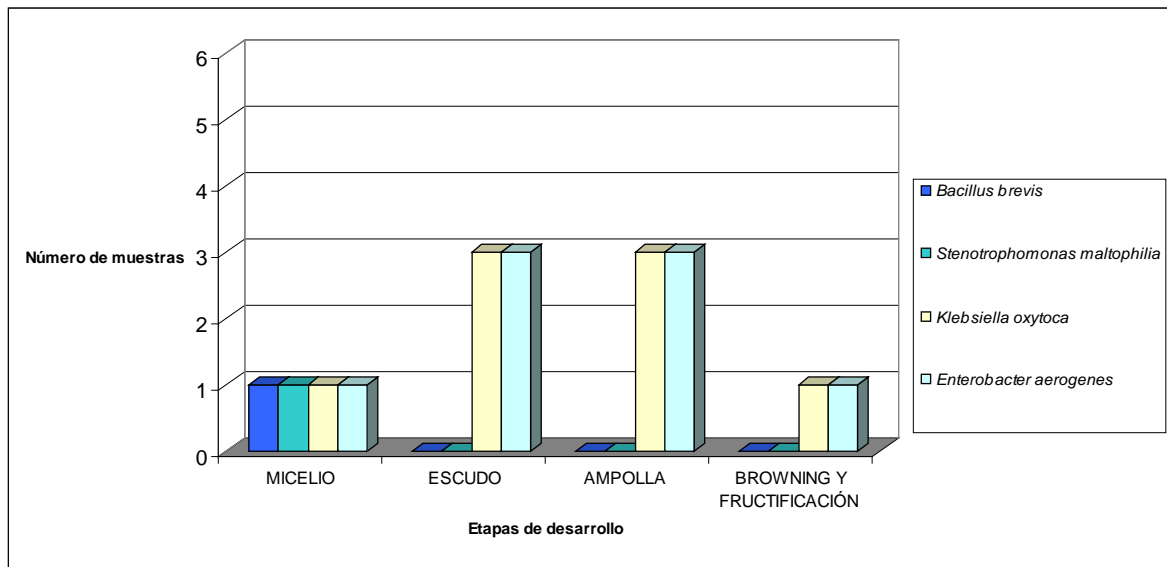
⁶⁰ KAI H, U EFFMERT, G BERG, PIECHULLA B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of plant pathogens *Rhizoctonia solani*. Microbiol Arco 187. 2006, pp. 351-360.

⁶¹ ZHANG Z. and YUEN G. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. PHYTOPATHOLOGY. Vol. 89, No. 9, 1999, pp. 817-822.

⁶² DUNNE, C., J. CROWLEY, Y. MOËNNE-LOCCOZ, D. N. DOWLING, F. J. BRUIJN, AND F. O'GARA. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W18 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology 143, 1997, pp. 3921-3931.

⁶³ CHERNIN L, ISMAILOV Z, HARAN S, CHET I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 61, 1995, pp. 1720-1726.

Los resultados muestran que las especies *K. oxytoca* y *E. aerogenes* están presentes en todas las etapas de desarrollo y en mayor proporción en las etapas de escudo y ampolla.



Gráfica 6: Frecuencias de bacterias contaminantes presentes en las etapas de desarrollo del Shiitake cultivado en amarillo-salvado de trigo (Bogotá).

En general, analizados los resultados de las bacterias contaminantes se observó un comportamiento diferente al encontrado en los hongos contaminantes; no es tan clara la influencia de la etapa de desarrollo del Shiitake con el tipo de especies contaminantes presentes, pues se observó la tendencia a presentar las mismas especies en todas o casi todas las etapas de desarrollo y en cada uno de los sustratos analizados. Como ocurrió con las especies *A. tumefaciens* y *Micrococcus spp.* en el sustrato de eucalipto-salvado de trigo-Bogotá, con las especies *B. cereus* y *B. brevis* en el sustrato de eucalipto- cascarilla de arroz-Salto del Tequendama y con las especies *K. oxytoca* y *E. aerogenes*, en el sustrato amarillo-salvado de trigo-Bogotá.

Sin embargo se registró una tendencia a la disminución de la presencia de bacterias contaminantes en la última etapa de desarrollo, que es más evidente en los sustratos de amarillo-salvado de trigo-Bogotá y eucalipto-salvado de trigo- Bogotá.

En la etapa micelio en el sustrato amarillo-salvado de trigo-Bogotá se presentó una mayor diversidad y menor frecuencia de especies contaminantes que en el resto de las etapas y sustratos.

7.3. Caracterización de las especies de hongos contaminantes encontradas

7.3.1 *Trichoderma crassum*

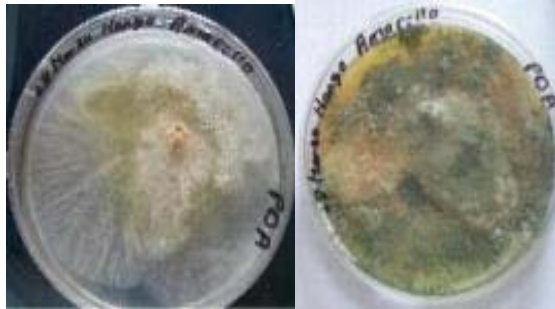


Foto 2: Colonia de *T. crassum* en medio de cultivo PDA: Izquierda: 5 días de crecimiento; derecha: 20 días de crecimiento. Fuente: autora, 2010.

❖ Características macroscópicas

Colonia algodonosa de color blanco amarillento al inicio de su crecimiento, a los 10 días aparecieron los conidios verdes en agregados menores de 1 mm de diámetro y se presentó un pigmento amarillo difundido en el medio de cultivo (foto 2). En PDA después de 72 horas de inoculación en la oscuridad a 25°C se observó un crecimiento de la colonia de 2,5 a 3,5 cm de radio. Las características macroscópicas están de acuerdo a lo expuesto por Samuels et al⁶⁴ para esta especie.

❖ Características microscópicas



Foto 3: *T. crassum* visto al microscopio (40 X). Fuente: autora, 2010.

⁶⁴ SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

T. crassum presenta conidióforos con ramificación irregular (foto 3), sus ramificaciones se derivan por separado del eje principal y miden entre 20,0 a 28,6 micras de largo por 5,3 a 6,1 micras de ancho. En la punta de los conidióforos se observan una o dos fiálides, estas son rectas y cortas y miden entre 13,6 y 15,7 micras de largo x 4,3 a 4,6 micras en el punto más ancho y 3,0 a 3,3 micras en la base. Se forman verticilos de 2 a 5 fiálides. Los conidios son verdes, lisos y ovoides y miden entre 3,7 a 5,3 micras de largo por x 2,6 a 3,7 micras de ancho. No se observaron clamidosporas. Estas características microscópicas están de acuerdo a lo expuesto por Samuels et al ⁶⁵ para esta especie.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

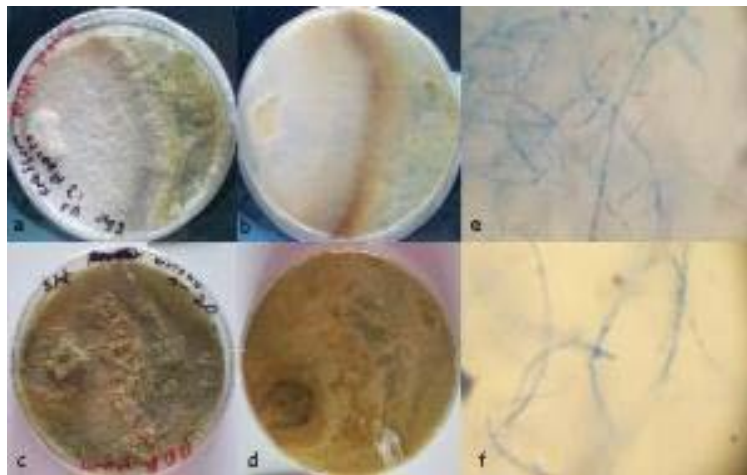


Foto 4: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *T. crassum* (hongo verde amarillento): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake degradado por *T. crassum* visto a 40X. Fuente: autora, 2010.

A los 15 días de haberse sembrado el Shiitake en la caja de petri se inoculó el hongo *T. crassum* y a los 5 días de la inoculación se observó una zona de demarcación color marrón oscuro entre los dos hongos. A los 10 días en la (foto 3 a y b) se observó como la colonia de la especie *T. crassum* invadió hasta la mitad de la caja de petri y a los 20 días se evidenció como esta especie ya ha invadido la totalidad de la caja de petri causando la degradación y desaparición del micelio del Shiitake.

⁶⁵ SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

La formación de una zona de demarcación oscura color marron entre el Shiitake y *Trichoderma* fue estudiada por Savoie y Mata⁶⁶ en 1999. Dichos autores observaron que *Trichoderma* induce cambios en el patrón de isoenzimas lacasas secretadas por *L. edodes* ejerciendo una acción antagonica hacia *Trichoderma*. La estimulación de la actividad lacasa estaba vinculada con la formación de la zona de color marrón que es indicadora de la oxidación de los polifenoles en el contacto entre los micelios de los dos antagonistas.

A nivel microscópico se observó que en la zona intermedia se presentó lisis y desaparición del micelio del Shiitake como se observa en la parte f de la foto 3. Estos resultados evidenciaron una clara actividad antifúngica de la especie *T. crassum* hacia el *L. edodes*.

Como se mencionó anteriormente, la actividad antagonista de la especie *T. crassum* hacia otros hongos ya había reportada. En un estudio realizado en Brasil por De Mello et al⁶⁷ se identificó a esta especie como antagonista de *Sclerotium rolfsii* Sacc., un fitopatógeno que ataca plántulas, plantas herbáceas y plantas leñosas ocasionando grandes pérdidas en cultivos de importancia económica como el de algodón. En ese estudio se propuso la especie *T. crassum* como un posible agente biocontrolador de este hongo.

7.3.2 *Trichoderma aggressivum*



Foto 5: Colonia de *T. aggressivum* en medio de cultivo PDA: a la izquierda foto del anverso de la colonia y a la derecha foto del inverso de la colonia. Fuente: autora, 2010.

⁶⁶SAVOIE J. and MATA G. The antagonistic action of *Trichoderma spp.* hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15, 1999, pp. 369-373.

⁶⁷ DE MELLO et al Op. Cit., p. 21

❖ Características macroscópicas

En los 5 primeros días la colonia era blanca sin pigmento de difusión en el medio de cultivo. El radio de la colonia en PDA después de las 72 horas a 25°C se encontraba entre 5 y 6 cm. Después de 5 días aparecieron los conidios verdes formando un anillo grueso en la zona central, cerca al punto de inoculación y otro anillo delgado en el borde de la caja de petri como se observa en la foto 5. No se observaron pústulas.

❖ Características microscópicas

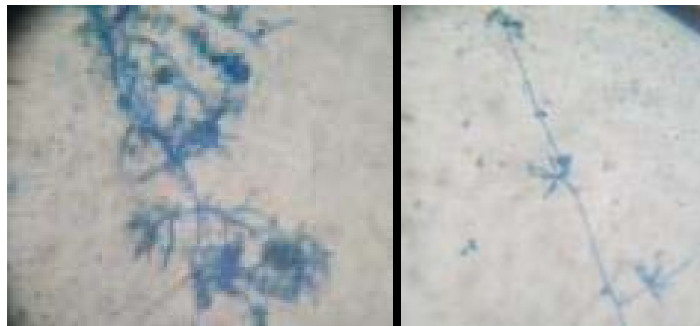


Foto 6: *T. aggressivum* vista al microscopio (40 X). Fuente: autora, 2010.

Se observaron conidióforos con un eje principal, en su mayoría poco ramificado con largos “entrenudos” de 20 a 50 micras y con ramas que derivan del eje principal en general por separado (foto 6). Las ramas están a 90° o menos con respecto al eje principal.

Fiálides con forma de botella, amplias en el medio y fuertemente restringidas por debajo de la punta formando un cuello estrecho, miden entre 5,7 a 7,8 micras de largo y 2,7 a 3,5 micras de ancho en el medio y 1,7 a 2,5 micras de ancho en la base. Las fiálides terminan en forma de espiral en la parte terminal o en solitario.

Se observaron conidios verdes lisos subglobosos que miden entre 3,0 y 3,5 de largo x 2,5 a 3,2 micras de ancho. Según estas características macroscópicas y microscópicas y utilizando la clave propuesta por Samuels et al⁶⁸ se determinó esta especie como *Trichoderma aggressivum*

⁶⁸ SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

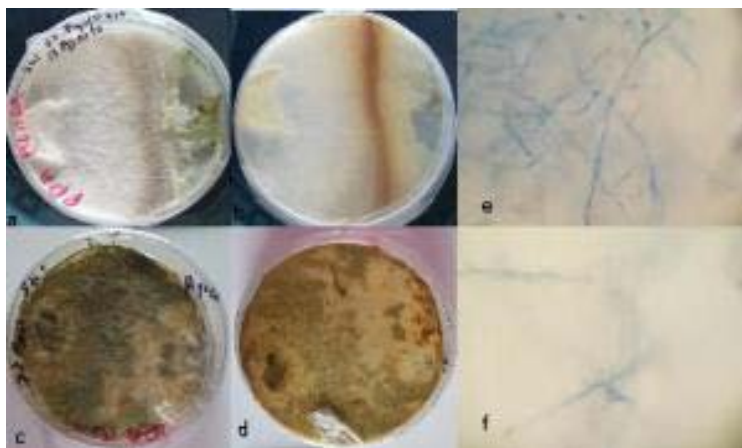


Foto 7: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *T. aggressivum* (hongo verde): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake degradado por *T. aggressivum* visto a 40X. Fuente: autora, 2010.

El hongo *T. aggressivum* se desarrolló rápidamente en la caja de petri, a los 5 días de inoculado empezó a ocupar el espacio que antes ocupaba el Shiitake. Se observó a los 10 días de inoculado (foto 7 a y b) una línea de contacto color marrón oscuro entre las dos especies. A los 20 días se observó la degradación y desaparición del micelio del Shiitake (foto 6 partes c y d). La formación de una línea marrón según Savoie y Mata⁶⁹ es producto de la oxidación de los polifenoles en el contacto entre el micelio de los dos antagonistas vinculada a la estimulación de la actividad lacasa que junto con la producción de hifas emergentes son respuestas de *L. edodes* al ataque de *Trichoderma spp.*

Al observar al microscopio en la zona intermedia entre el *L. edodes* y *T. aggressivum* se evidenció la destrucción de las hifas del Shiitake (foto 6 parte f) en comparación con el micelio no invadido por *T. aggressivum* (foto 6 parte e).

Trichoderma aggressivum es una especie que como su nombre lo indica es muy agresiva, un mecanismo utilizado por ella es la secreción de enzimas que degradan la pared celular del hongo al cual ataca. En un estudio realizado por Guthrie y Castle⁷⁰ se determinó que en cultivos duales este

⁶⁹SAVOIE J. AND MATA G. Op. Cit., p. 34

⁷⁰GUTHRIE J and CASTLE A. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. Can J Microbiol. 2006 Oct, 52(10): 2006, pp. 961-7.

hongo produce una actividad de quitinasa dada por la secreción de tres N-acetilglucosaminidasas, una quitobiosidasa y una endoquitinasa siendo esta última la que mostró la mayor actividad y que podría ser importante para predecir la actividad antifúngica.

Los anteriores resultados evidencian claramente el antagonismo entre *L. edodes* y *T. aggressivum*. Según Romero et al ⁷¹ la especie *T. aggressivum* ya había sido caracterizada como una de las especies que afecta cultivos comerciales de *L. edodes* y ha generado grandes pérdidas económicas.

7.3.3 *Trichoderma harzianum*

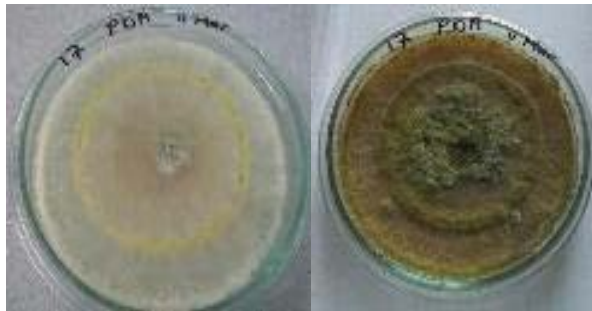


Foto 8: Colonia de *T. harzianum* en medio de cultivo PDA: a la izquierda foto a los 8 días, a la derecha foto a los 20 días. Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Se observó en los 5 primeros días la formación de una colonia blanca con pigmento amarillo difundido en el medio de cultivo, después de 6 a 8 días de crecimiento, se observó la aparición de conidios formando anillos concéntricos alrededor del punto de inoculación (foto 8 parte izquierda) Al principio, los conidios son de color amarillo y se van tornando verdes oscuros con el tiempo. El medio de cultivo toma una coloración naranja oscuro al paso de los días (foto 8 parte derecha). El radio de colonia en PDA después de 72 horas a 25 °C medía de 5 a 6 cm. No se observaron pústulas.

⁷¹ ROMERO et al, Op. Cit., p. 15

❖ Características microscópicas

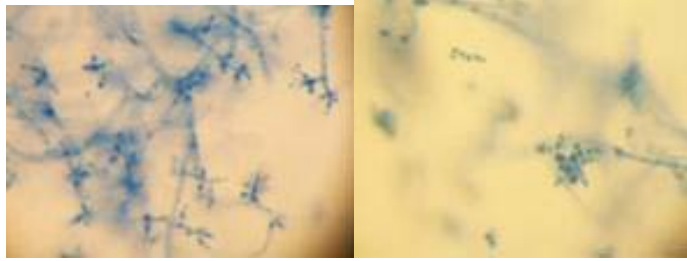


Foto 9: *T. harzianum* vista al microscopio (40 X) Fuente: autora 2010.

Los conidióforos presentan ramificación en parejas (foto 9 parte izquierda) donde las ramas se encuentran a 90° con respecto al eje central y miden más de 150 micras de longitud. Se observaron fiálides cilíndricas (foto 9 parte izquierda) que forman un espiral en la punta de las ramas o están en solitario, estas miden entre 6,5 a 6,7 micras de largo y 2,5 a 3,5 micras de ancho. Se observaron conidios son lisos, verdes y subglobosos (foto 9 parte derecha) que miden entre 2,7 a 3,5 micras largo x 2,5 a 3,0 micras ancho.

Teniendo en cuenta las anteriores características macroscópicas y microscópicas y la clave propuesta por Samuels et al⁷² se clasificó como la especie como *T. harzianum*.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

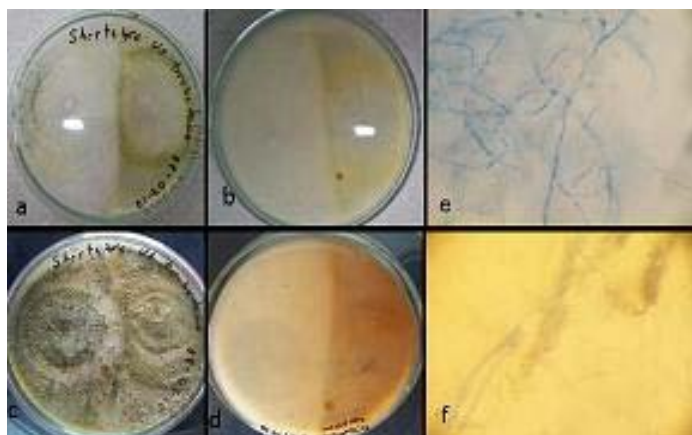


Foto 10: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *T. harzianum* (hongo verde amarillento): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de

⁷² SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, f micelio de Shiitake degradado por *T. harzianum* a 40X. Fuente: autora 2010.

En los cultivos duales de *T. harzianum* y *L. edodes* (foto 10 a y b) se observó claramente a los 10 días una reducción del crecimiento del Shiitake y la aparición de una zona de coloración marrón en el medio de las dos especies. A los 20 días *T. harzianum* invadió completamente la superficie del micelio del Shiitake (Foto 9 parte c), pero en el inverso se observó que cada especie ocupaba la mitad de la caja de petri (Foto 9 parte d). El cubrimiento de sustratos de *L. edodes* con conidios fue descrito en el estudio hecho por Terashima et al⁷³.

La producción de la zona marrón como se mencionó anteriormente esta vinculada a la producción de lacasas, esta actividad junto con la producción de hifas emergentes, según Savoie et al,⁷⁴ han sido caracterizadas como una respuesta de *L. edodes* al ataque de *T. harzianum*.

Al microscopio se observan (Foto 9 parte f) daños en el micelio del Shiitake, procesos de deformación, engrosamiento, fragmentación y lisis del micelio posiblemente debido a la acción de enzimas hidrolíticas; según Romero et al⁷⁵ *T. harzianum* produce enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular de muchos microorganismos y luego los utiliza como fuente de nutrientes.

T. harzianum mostró ser patógeno para el Shiitake puesto que invadió su superficie, restringió su crecimiento y lo degradó; esto concuerda con lo reportado por Seaby⁷⁶ quien afirma que *T. harzianum* invade rápidamente el sustrato y obstaculiza el crecimiento del micelio en hongos comestibles como de *Pleurotus spp.* mediante la producción de toxinas y antibióticos, al tiempo que ocasiona un descenso del nivel de pH hasta valores de 4-5 que son más favorables para su desarrollo.

Según Romero et al⁷⁷ *T. harzianum* actúa como un patógeno del cultivo de champiñón y *Pleurotus ostreatus* ocasionando muchas pérdidas en las cosechas de estos hongos y ha sido caracterizado como el causante de las epidemias en plantas productoras de hongos comestibles en Norteamérica,

⁷³ TERASHIMA et al. Op. Cit., p. 26

⁷⁴ SAVOIE et al, 2001 Op. Cit., p. 22

⁷⁵ ROMERO et al, Op. Cit., p. 15

⁷⁶ SEABY 2001 Op. Cit., p. 2

⁷⁷ ROMERO, et al, Op. Cit., p. 15

Islas Británicas, India e Irlanda a principios de 1980; así mismo se sabe que actúa como controlador biológico y antagonista natural de una amplia gama de fitopatógenos como: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia spp.*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.* y *Alternaria spp.* entre otros.

7.3.4 *Trichoderma viride*



Foto 11: Colonia de *T. viride* en medio de cultivo PDA. Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Colonia de color blanco sin pigmento de difusión en el medio de cultivo, después de 5 a 6 días de ser cultivado en la oscuridad aparecieron los conidios formando anillos concéntricos rodeando el punto de inoculación (foto 11). A los 3 días se registró el radio de la colonia entre 3,5 a 4,0 cm.

❖ Características microscópicas



Foto 12: *T. viride* visto al microscopio (40 X). Fuente: autora 2010.

Se observaron conidióforos con ramas laterales algunas en pares y otras no que surgieron en un ángulo cercano a los 90°, presentando un eje central

que media de 100 a 150 micras de largo. Se apreciaron fiálides cilíndricas con un cuello alargado, recto y con un gancho que midieron de 7,0 a 11,5 micras de largo y 2,5 a 3,5 micras de ancho en su parte más ancha y 1,8 a 2,5 micras de ancho en la base. Las fiálides surgieron del eje principal por separado y en verticilos 2 o 3. Se observaron conidios verdes oscuros, lisos y subglobosos que median de 2,7 a 3,5 micras largo x 2,5-3,0 micras ancho.

De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas anteriores y siguiendo la clave de Samuels et al⁷⁸ se clasificó esta especie como *T. viride*.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

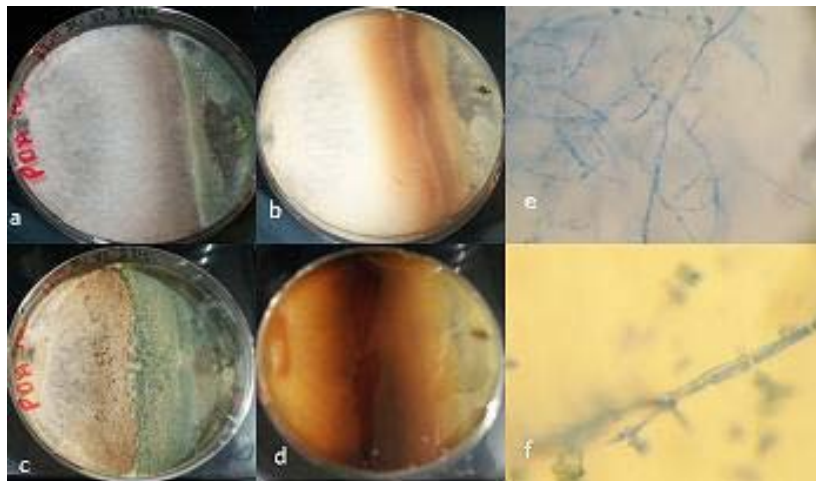


Foto 13 Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *T. viride* (hongo verde amarillento): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake degradado por *Trichoderma viride* a 40X. Fuente: autora 2010.

T. viride al ser inoculado en las cajas de petri donde estaba creciendo previamente el Shiitake empezó a competir por el espacio y restringió el crecimiento de este hongo (foto 13 a y b). Se observó una zona de demarcación de coloración marrón en el medio de los dos hongos la cual como se explicó anteriormente, según Savoie⁷⁹ es evidencia de la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles como respuesta de *L. edodes* al ataque y a la presencia de *Trichoderma spp.* Con el paso de los días se redujo el espacio ocupado por el micelio del Shiitake, luego se observó como

⁷⁸ SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

⁷⁹ SAVOIE et al Op. Cit., p. 23

a los 20 días (Foto 12 parte c) se encontraba restringido el micelio del Shiitake hasta la mitad de la caja de petri.

Microscópicamente se observó el enrollamiento del micelio del Shiitake por parte del micelio del *T. viride*, hecho que ya había sido reportado como micro-parasitismo por Eziashi et al⁸⁰ en ensayos de actividad biológica de *T. viride* contra *Ceratocystis paradoxa*. Además se observó la lisis de algunas hifas del Shiitake, un colapso en el micelio y desorganización celular que ya habían sido reportados por Fan et al⁸¹.

Según Romero et al,⁸² *T. viride* actúa como un competidor en el cultivo de champiñón y *Pleurotus ostreatus*. Según los anteriores resultados se ve claramente que también es un antagonista y un parasito de *L. edodes*, pues redujo el espacio ocupado por éste y mostró un fuerte antagonismo reflejado en el crecimiento de la zona de demarcación que al cabo de los 20 días llegó a alcanzar los 3 cm de ancho y se entrelazó en medio del micelio del Shiitake (Foto 13 partes d y f).

Diferentes estudios han evidenciado el antagonismo de *T. viride*; según Durrell⁸³ este efecto es producido por sus exudados tóxicos y por su acción parásita o saprofita. Nahm⁸⁴ afirma que el daño es causado por celulasas y Eziashi et al⁸⁵ afirma que puede ser producido por acetaldehídos. Abadi⁸⁶ reporta la presencia de Trichogin A IV, un compuesto producido por esta especie que se ha registrado con actividad antimicrobiana.

⁸⁰ EZIASHI E. I., OMAMOR I. B. AND ODIGIE E. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (4), 2007, pp. 388-392. [on line] URL: <http://www.academicjournals.org/AJB> (Consulted oct. 2010).

⁸¹ FAN et al Op. Cit., p. 12

⁸² ROMERO, O. et al, Op. Cit., p. 15

⁸³ DURRELL L. W. Hyphal invasion by *Trichoderma viride*. Mycopathologia vol 35, N° 2, 1966, pp 138-144.

⁸⁴ NAHM KH, CARLSON CW (1985). Effects of cellulase from *Trichoderma viride* on nutrient utilization by broilers. Poultry Sci., 64(8): 1536-1540.

⁸⁵ EZIASHI Op. Cit., p. 42

⁸⁶ ABADI, Khalid M. Novel plant bio-protectants based on *Trichoderma spp.* strains with superior characteristics. Dottorato thesis, Università degli Studi di Napoli "Federico II". 2008

7.3.5 *Hypocrea cremea*



Foto 14: Colonia de *H. cremea* en medio de cultivo PDA. Fuente: autora, 2010.

❖ Características macroscópicas

Colonia blanca, algodonosa y sin pigmento de difusión en el medio (foto 14). El radio de la colonia después de 10 días de inoculado a 25°C es de 5 cm. A los 15 días de inoculado empiezan a aparecer los primeros conidios verdes dispersos en algunas zonas de la colonia. En algunos casos se forman pústulas en los bordes de la caja. En dos de las cajas se formó un estroma circular amarillo pálido un poco transparente de 1 cm de diámetro.

❖ Características microscópicas



Foto 15: *H. cremea* vista al microscopio (40 X). Fuente: autora, 2010.

Se observaron conidióforos con ramificación irregular, las ramas nacen solitarias del eje central y son más largas hacia la base (foto 15). Las fiálides son cilíndricas, estrechas en la punta y en algunas se observa un pequeño gancho (foto 15 parte derecha), estas están agrupadas en verticilos de 1 a 5, miden entre 9,0 y 10,0 micras de largo y de 3,2 a 3,5 micras de ancho. Los conidios verdes, lisos, ovoides que miden entre 4,0 a 4,5 micras de largo por 3,5 a 3,7 micras de ancho. Teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas anteriores y siguiendo la clave de Samuels et al⁸⁷ se clasificó esta especie como *H. Cremea*.

⁸⁷ SAMUELS et al Op. Cit., p. 20

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

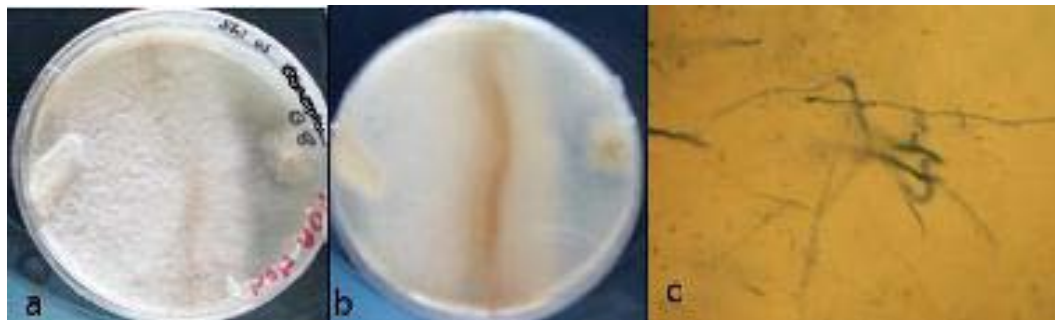


Foto 16 Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco a la izquierda de la caja de petri) vs *H. cremea* (hongo blanco parte derecha de la caja de petri): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** micelio de Shiitake degradado por *H. cremea* a 40X. Fuente: autora, 2010.

Cuando el micelio del Shiitake entró en contacto con el micelio de *H. cremea* se produjo una línea color marrón entre los dos micelios (foto 12 Parte a y b). Esta línea ha sido descrita por Savoie et al⁸⁸ como señal de la secreción de metabolitos extracelulares de *L. edodes* como las lacasas y la oxidación de polifenoles que contribuyen a la capacidad del hongo para resistir los ataques de otras especies como *Trichoderma*.

A los 15 días se observó claramente la esporulación de *H. cremea* cercana a la zona de demarcación. *H. cremea* va ocupando el espacio del Shiitake. En las muestras observadas no desapareció totalmente el micelio del Shiitake, se mantuvieron las dos especies de hongos y la línea de división entre las dos tomó una coloración marrón más oscura.

Microscópicamente (foto 16 parte c) se observó el engrosamiento, la partición de las hifas y la lisis del micelio del Shiitake. Estos resultados demuestran el antagonismo de *H. cremea* con *L. edodes* evidenciado en la competición por el espacio y la degradación del micelio.

⁸⁸ SAVOIE et al Op. Cit., p. 22

7.3.6 *Cladosporium cladosporioides*



Foto 17: Colonia de *C. cladosporioides* en medio de cultivo PDA. Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Colonia en PDA con colores que van del verde-oliváceo al negro, presentando un revés negro verdoso y aterciopelado (foto 17).

En la oscuridad, a una temperatura de 25°C, la colonia midió 3 cm de diámetro a los 5 días y a los 10 días midió de 5 a 7 cm de diámetro.

❖ Características microscópicas



Foto 18: *C. cladosporioides* visto al microscopio (40 X). Fuente: autora 2010.

Las hifas septadas, hialinas y oliváceas midieron entre 3,1 y 5,0 micras de ancho y más de 300 micras de largo (foto 18). Se observaron Conidióforos morfológicamente similares a las hifas vegetativas, rectos o sinuosos, sencillos o ramificados y septados. Estos medían hasta 360 micras de largo por 3 a 4 micras de ancho, tenían el ápice truncado con 1 a 3 dentículos y con cicatrices donde nacen los conidios. Los conidios son de color verde oliva septados y lisos, ramificados en cadenas y elipsoidales con extremos truncados (foto 18 círculo rojo). Estos medían de 5 a 7 micras de largo x 2,9 a 3,1 micras de ancho.

Según las anteriores características macroscópicas y microscópicas de acuerdo a lo registrado por Domsch et al ⁸⁹ se le dio la clasificación de *C. cladosporioides*.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

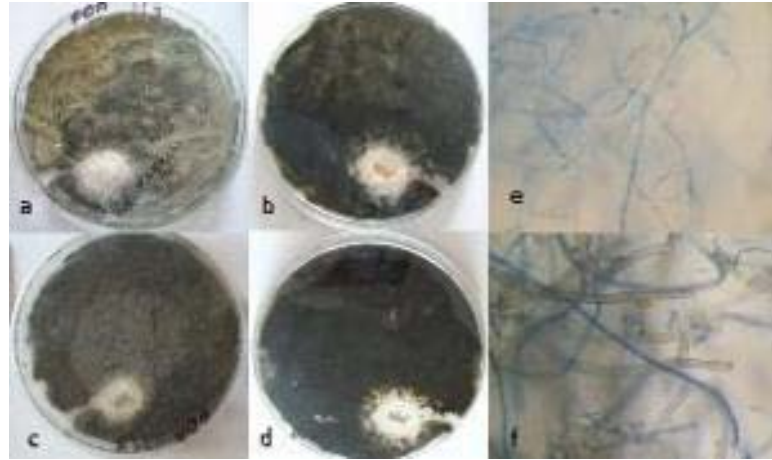


Foto 19: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *C. cladosporioides* (hongo negro): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 8 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake y de *C. cladosporioides* visto a 40X. Fuente: autora, 2010.

C. cladosporioides creció rápidamente llegando a invadir en menos de 8 días todo el espacio de la caja de petri donde no había crecido aún *L. edodes* (Foto 19 partes a y b). Este hongo impidió el crecimiento del Shiitake, pues al cabo de los 20 días no se registró aumento en el tamaño de la colonia (foto 19 partes c y d). Microscópicamente se observaron las hifas de los dos hongos compartiendo el mismo espacio (foto 19 parte f), no se presentó lisis ni engrosamiento del micelio del Shiitake en comparación con el micelio del Shiitake sin contaminantes (Foto 18 parte e).

Teniendo en cuenta que *C. cladosporioides* ataca la madera y que se aisló del aserrín donde creció el shiitake, se puede observar que es una especie competidora por el sustrato pero que no afecta directamente el micelio del Shiitake.

Según Domsch et al⁹⁰ la patogenicidad *C. cladosporioides* no está totalmente dilucidada y en diversos estudios se sugiere que la capacidad como parásito es limitada.

⁸⁹ DOMSCH et al., Op. Cit., p. 24

⁹⁰ DOMSCH et al., Op. Cit., p. 24

7.3.7 *Penicillium roseopurpureum*



Foto 20: Colonia de *P. roseopurpureum* a los 15 días de inoculado en medio de cultivo agar Czapek, a la izquierda foto del anverso y a la derecha foto del inverso. Fuente autora, 2010.

❖ Características macroscópicas

En el agar Czapek se observó el crecimiento de varias colonias pequeñas de color verde claro y la esporulación tomó una coloración blanca grisácea. En el inverso de las colonias se observaron tonos naranja que se tornaron color tierra a los 15 días. En el medio de cultivo se presentó un exudado de color rosa a color vinoso (foto 20).

❖ Características microscópicas

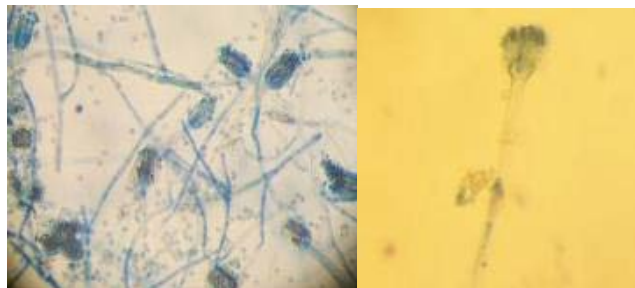


Foto 21: *P. roseopurpureum* visto al microscopio a la izquierda 40X a la derecha ampliada a 60X. Fuente: autora, 2010.

Se observaron conidióforos monoverticilados cortos y entrelazados, midiendo menos de 50 micras de largo por 1,5 a 2,0 micras de ancho, son de pared lisa, poseen un verticilo terminal de 8 a 10 esterigmas. Se observaron conidios globosos, verdes y lisos que medían entre 2,0 a 2,2 micras de largo

por 2,2 a 2,5 micras de ancho. Esta especie se clasificó como *P. roseopurpureum* siguiendo las claves de Raper⁹¹ y Gómez de Membrillejo⁹²

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

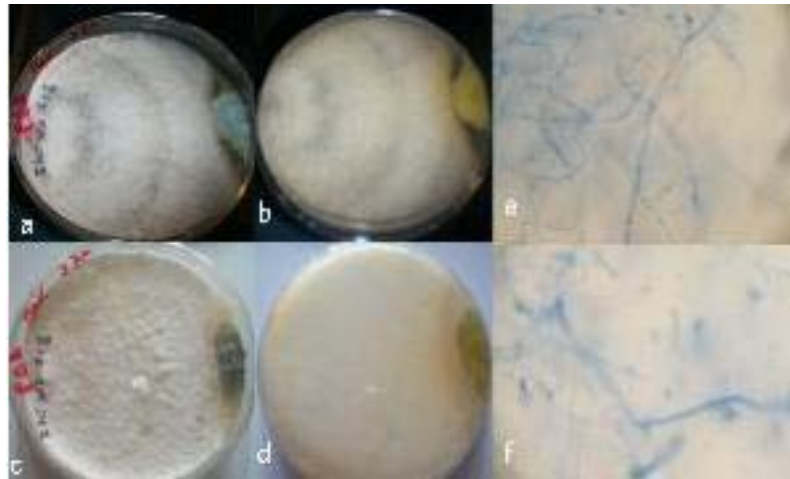


Foto 22: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *P. roseopurpureum* (hongo verde) : **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 15 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake y micelio de *P. roseopurpureum* visto a 40X. Fuente autor. 2010.

Se observó el desarrollo de *P. roseopurpureum* en forma restringida (foto 22 parte a y b) y una zona de demarcación color marrón claro entre los micelios de los 2 hongos (foto 21 parte d). Esta zona se había observado en los cultivos duales de *L. edodes* con las especies de *Trichoderma*, como se mencionó anteriormente según Savoie et al.⁹³ Esta zona es señal de la secreción de lacasas y la oxidación de polifenoles que contribuyen a la capacidad de *L. edodes* para resistir los ataques de otras especies como *Trichoderma*.

El micelio del Shiitake se desarrolló normalmente pero no ocupó el espacio donde se encontraba *P. roseopurpureum* (Foto 21 parte c y d). Al

⁹¹ RAPER, K. and THOM, C. A Manual of the Penicillia. International Books and Periodicals Supply Service. New Delhi, India. 1984.

⁹² GÓMEZ DE MEMBRILLERO J. Clave determinativa de las especies del género *Penicillium* 1960. [en línea] URL: <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6407/1/N%2017%20%20Clave%20determinativa%20de%20las%20especies%20del%20genero%20Penicillium.pdf> (Consultado Julio 2010).

⁹³ SAVOIE et al 2001 Op. Cit., p. 22

microscopio se observaron algunas hifas de Shiitake parcialmente destruidas entremezcladas con hifas de *P. roseopurpureum* (Foto 21 parte f).

Según estos resultados *L. edodes* puede estar generando metabolitos que controlan el crecimiento de *P. roseopurpureum* y a su vez este hongo *esta* afectando el micelio del Shiitake.

En un trabajo realizado por Torrenegra et al,⁹⁴ se identificó la especie *P. roseopurpureum* como productora de metabolitos con actividad antifúngica frente a hongos como *Fusarium oxysporum*.

7.3.8 *Penicillium raciborskii*

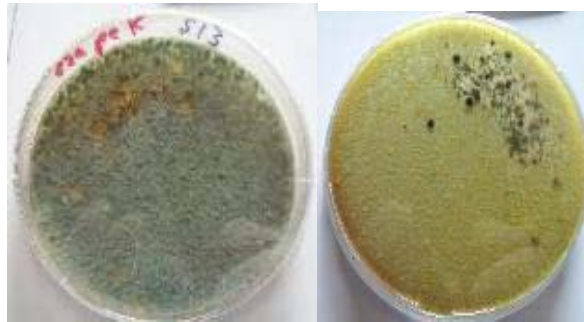


Foto 23: Colonia de *P. raciborskii* en medio de cultivo agar CzapeK a la izquierda foto del anverso a la derecha foto del inverso de la colonia. Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Son colonias verde azuladas que cambiaron al envejecer a pardo anaranjado, son onduladas y se dispersaron por toda la caja de petri. Presentaron áreas conidiales con gotas incoloras y se observó al reverso un color amarillo-verdoso (foto 23).

⁹⁴ TORRENEGRA et al, Op. Cit., p. 24

❖ Características microscópicas

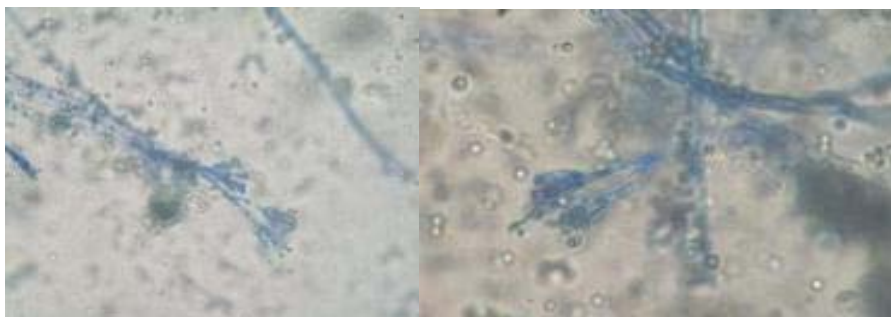


Foto 24: *P. raciborskii* visto al microscopio (40X). Fuente: autora 2010.

Los conidióforos nacieron de la superficie del micelio y dieron lugar a estructuras diverticuladas, eran rectos y median entre 400 y 600 micras de largo por 2,5 a 3,5 micras de ancho. Se observaron hifas flojas y muy largas. Se detectaron conidios verdes grisáceos, lisos y globosos, median de 2,2 a 3 micras de radio.

De acuerdo a las anteriores características morfológicas se clasificó la especie como *P. raciborskii* siguiendo la clave de Gómez de Membrillejo⁹⁵.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

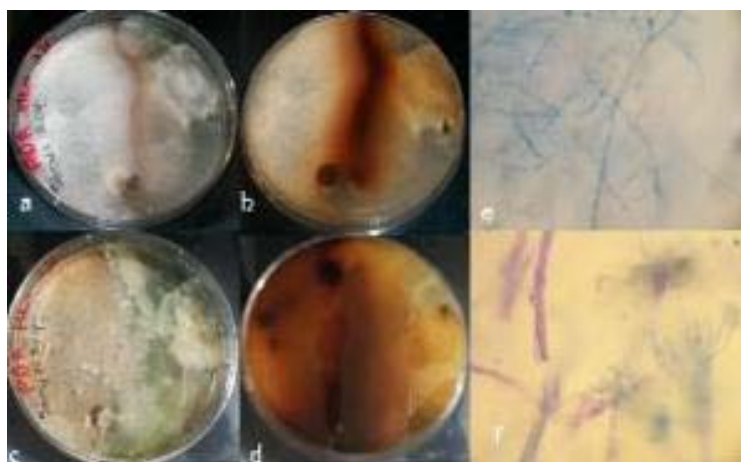


Foto 25: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *P. raciborskii*, (hongo blanco con verde): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake y micelio de *P. raciborskii*, visto a 40X. Fuente: autora 2010.

⁹⁵ GÓMEZ DE MEMBRILLEJO. Op. Cit., p. 48

P. raciborskii empezó a ocupar el espacio que antes ocupaba el shiitake y a degradar su micelio (foto 25 partes a y b).

Se formó una zona de demarcación color marrón oscuro entre los 2 hongos que con los días se hizo cada vez mayor llegando a ocupar la mitad de la caja de petri a los 20 días (foto 25 parte d). La zona marrón, como ya se ha mencionado según Savoie et al⁹⁶, es señal de la secreción de lacasas y la oxidación de polifenoles por parte de *L. edodes* para resistir los ataques de otras especies como *Trichoderma*. Microscópicamente se observó el ensanchamiento, ruptura y lisis de la mayoría de las hifas del shiitake.

Estos resultados muestran un evidente antagonismo entre estas dos especies. *P. raciborskii* lisó y destruyó el micelio de *L. edodes* y éste al parecer reaccionó con una gran respuesta enzimática. Según Piontelli et al⁹⁷ *P. raciborskii* posee una gran versatilidad nutricional, por lo cual es probable que esté utilizando el micelio del Shiitake como alimento.

7.3.9 *Rizopus stolonifer*



Foto 26: Colonia de *R. stolonifer* en medio de cultivo PDA a la izquierda anverso y a la derecha inverso de la colonia. Fuente: autora, 2010.

❖ Características macroscópicas

Se observó una colonia algodonosa y densa, al principio fue de color blanco y después se tornó gris oscuro (foto 26). Se observó un aéreo que creció rápidamente, cubriendo toda la caja de petri al cabo de cinco días.

⁹⁶ SAVOIE et al Op. Cit., p. 23

⁹⁷ PIONTELLI et al Op. Cit., p. 24

❖ Características microscópicas

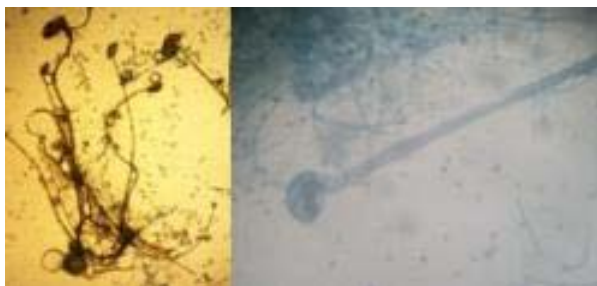


Foto 27: *R. stolonifer* visto a la izquierda al microscopio a 10X y a la derecha visto a 40X. Fuente: autora 2010.

Se observaron esporangióforos de color pardo oscuro sin ramificaciones que medían entre 0,5 y 1,5 mm de largo x 20 micras de ancho. Estos nacieron de un nudo de rizoides bien desarrollados. Los esporangios fueron esféricos negros y brillantes con columela y median entre 100 y 250 micras de diámetro. Las esporangiosporas negras median de 8 a 15 micras de diámetro. El hongo presentó numerosos rizoides y espolones parduscos. De acuerdo a las características morfológicas anteriores y a la información obtenida en Rev Iberoam Micol⁹⁸ se clasificó como *R. stolonifer*.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

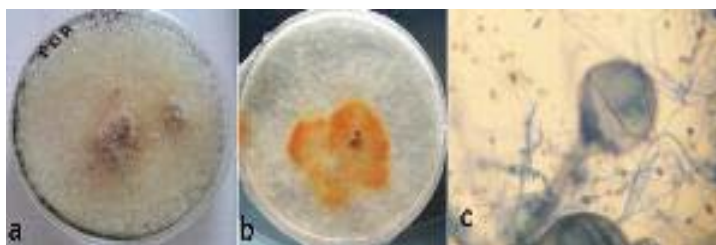


Foto 28: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *Rizopus stolonifer*, (hongo blanco con puntos negros)

a y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** micelio de Shiitake y micelio de *Rizopus stolonifer* visto al microscopio a 40X.

Al inocular *R. stolonifer* se observó que éste colonizó en 5 días todo el medio de cultivo creciendo sobre el micelio de *L. edodes* y tapando toda la superficie de la caja de petri. A los 10 días se observó el oscurecimiento del micelio del Shiitake y su descomposición (foto 27 a).

⁹⁸ REV IBEROAM MICOL. 2002 (B) *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin. PDF/Adobe Acrobat. [on line] URL: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF> (Consulted july. 2010).

En el inverso de la caja de petri se observó una coloración marrón que se torno oscura (Foto 27 b), esto puede deberse a una reacción por parte del Shiitake frente a la invasión *R. stolonifer*. Según Savoie et al⁹⁹ evidencia de la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles.

Microscópicamente se observa la presencia de los micelios de los 2 hongos entrelazados (foto 27c). En estos resultados se observó como *R. stolonifer* parasitó el micelio del Shiitake, lo degradó y lo pudrió. Este antagonismo ya había sido estudiado en trabajos de Arya et al¹⁰⁰ quienes reportaron que *R. stolonifer* es el agente causal del daño producido a numerosas bolsas de cultivo de shiitake.

R. stolonifer es además conocido por su rápido crecimiento que le permite colonizar la superficie de múltiples productos agrícolas; según la Rev Iberoam Micol¹⁰¹ puede causar la enfermedad conocida como la pudrición blanda de las frutas y hortalizas y para este proceso secreta enzimas pépticas que degradan y disuelven las pectinas de la lámina media de las células vegetales.

7.3.10 *Penicillium spinulosum*



Foto 29: Colonia de *P. spinulosum* en medio de cultivo agar Czapek, a la izquierda foto del anverso, a la derecha foto del inverso de la colonia. Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Las colonias inicialmente de color blanco que se tornaron verde azuladas a los 8 días, estas son vellutinas, aterciopelada y con un crecimiento flojo. Las colonias crecieron con rapidez por toda la caja de petri llegando a crecer entre 3,0 y 3,5 cm a los 8 días de inoculadas (foto 29). El inverso de la

⁹⁹ SAVOIE et al Op. Cit., p. 22

¹⁰⁰ ARYA A. and ARYA C. Production of Shiitake Mushroom on Tree Waste. XII World Forestry Congress. Québec Canada 2003. [on line] URL:<http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/WFC/XII/0881-B2.HTM> (Consulted sep. 2010).

¹⁰¹ Rev Iberoam Micol Op. Cit., p. 52

colonia es de color verde, con blanco y anaranjado y en ocasiones se presenta rosado.

❖ Características microscópicas



Foto 30: *Penicillium spinulosum* vista al microscopio (40X). Fuente autora 2010

Se observaron conidióforos monoverticilados surgieron casi exclusivamente del sustrato, son solitarios, pero algunas veces se encontraron con una rama saliendo al lado por debajo de la punta (foto 30). Estos median entre 400 y 600 micras de largo por 2,5 a 4,0 micras de ancho. Se observaron numerosas fiálides de 8 a 12 micras de largo y conidios verdes, rugosos y ovalados, que medían entre 3,0 y 3,5 micras de diámetro.

Se clasificó esta especie de acuerdo a la clave reportada por Pitt y Hocking.¹⁰²

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

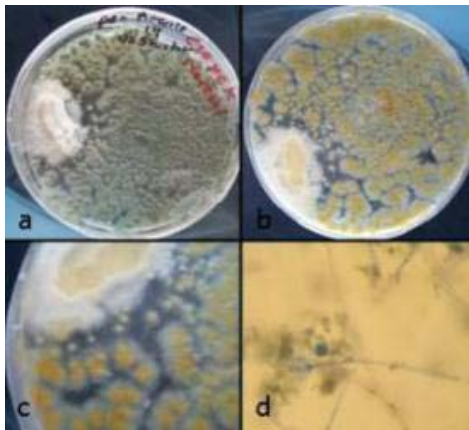


Foto 31: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *P. spinulosum*, (hongo verde reverso amarillo): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** inverso de las colonias a los 12 días de sembrado, **d** *Penicillium spinulosum* visto al microscopio a 40X. Fuente: autora 2010.

¹⁰² PITT J, and HOCKING A. Op. Cit., p. 25

P. spinulosum al ser inoculado en la caja de petri empezó a crecer rápidamente sobre el medio de cultivo, pero no afectó el crecimiento del micelio de *L. edodes* (foto 31 partes a y b). A los 12 días se observó el crecimiento del micelio del Shiitake por encima del micelio de *P. spinulosu*. No se observó ninguna afectación ni ninguna respuesta antagónica por parte del Shiitake (foto 31 parte c).

Al microscopio se observó el micelio de los dos hongos compartiendo el mismo espacio (foto 31 parte d) y no se observaron señales de alteración en ninguno de los 2 hongos. Según estos resultados *P. spinulosum* no parece afectar morfológica o fisiológicamente el desarrollo de *L. edodes*. Pitt y Hocking¹⁰³ reportan que no se conocen micotoxinas producidas por esta especie.

7.3.11 *Penicillium brevicompactum*

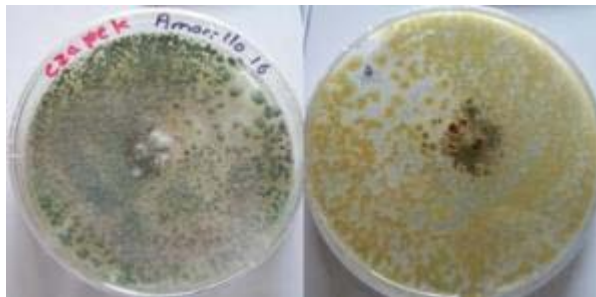


Foto 32: Colonia de *P. brevicompactum* en medio de cultivo agar CzapeK a la izquierda foto del anverso y a la derecha foto del inverso de la colonia.
Fuente: autora 2010.

❖ Características macroscópicas

Son colonias verdes de crecimiento moderado, aterciopeladas, no zonadas y arrugadas. Presenta en el reverso un color amarillento. Según Gómez de Membrillejo¹⁰⁴, crecen lanzando estolones aéreos, especialmente en el margen de la colonia, que alcanzan la periferia y allí se sumergen en el substrato extendiendo la colonia.

¹⁰³ PITT J, and HOCKING A. Op. Cit., p. 25

¹⁰⁴ GÓMEZ DE MEMBRILLERO J. Op. Cit., p. 48

❖ Características microscópicas

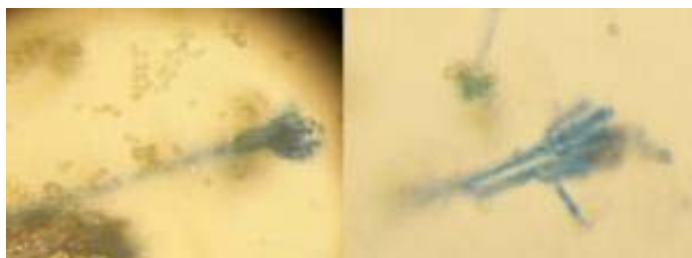


Foto 33: *P. brevicompactum* visto al microscopio (40X). Fuente: autora 2010.

Se observaron conidióforos de paredes lisas, tabicados y ramificados en sus extremos con méticas compactas que medían entre 9 y 12 micras. Estos nacieron solitarios y medían entre 100 y 300 micras. Se apreciaron fiálides en forma de botella de 6 a 9 micras de largo y conidios verdes, globosos y lisos que median 3,4 micras de largo por 2,8 micras de ancho.

Se clasificó como *P. brevicompactum* de acuerdo a sus características morfológicas y a la información obtenida en Rev Iberoam Micol¹⁰⁵

Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

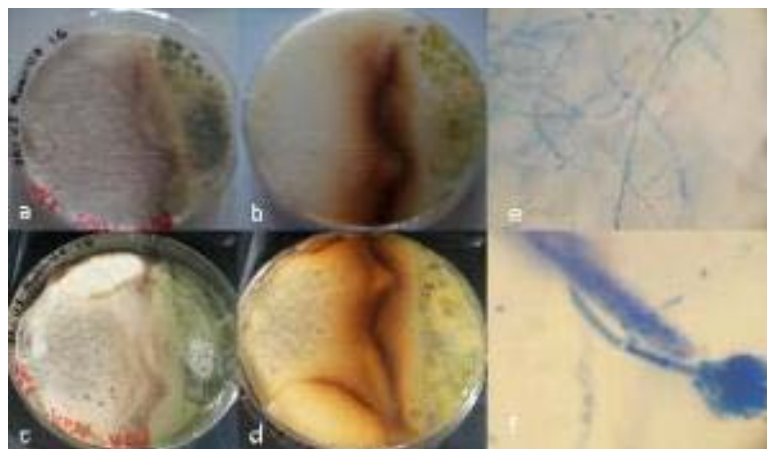


Foto 34: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *P. brevicompactum*, (hongo verde): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 15 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake y micelio de *P. brevicompactum*, visto al microscopio a 40X. Fuente: autora 2010.

¹⁰⁵ REV IBEROAM MICOL. 2002 (b) *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin. PDF/Adobe Acrobat. [on line] URL: <http://hongos-alergenicis.reviberoammicol.com/files/038.PDF> (Consulted july. 2010).

P. brevicompactum al ser inoculado en la caja de petri empezó a crecer y ocupar el espacio que antes ocupaba el shiitake (foto 34 partes a y b). Se formó una zona de demarcación color marrón oscuro muy evidente entre los dos hongos (foto 34 parte d), posiblemente evidenciando la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles en respuesta al ataque con micotoxinas. Se ha reportado por Canonica et al¹⁰⁶ que *P. brevicompactum* se caracteriza por producir una variedad de productos químicos bioactivos que tienen efectos anti-hongos.

Microscópicamente se observó la destrucción, fragmentación y lisis de la mayoría del micelio de *L. edodes* y la presencia de hifas de *P. brevicompactum* entrelazadas dentro del micelio destruido del Shiitake (Foto 33 parte f).

Ya se había reportado la afectación de *P. brevicompactum* a los cultivos de Shiitake. En un estudio realizado por Terashima¹⁰⁷ se infectaron artificialmente varios cultivos de Shiitake con este hongo obteniendo como resultado la alteración en la forma de los cuerpos fructíferos del Shiitake tornándose irregulares y de poco valor comercial.

Según Flórez,¹⁰⁸ *P. brevicompactum* produce micotoxinas como el ácido micofenólico el cual posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales, antipsoriásicas, antirreumáticas e inmunosupresoras.

7.3.12 *Trichoderma atroviride*



Foto 35: Colonia de *T. atroviride* en el medio de cultivo PDA a la izquierda foto anverso de la colonia a la derecha, foto del inverso de la colonia. Fuente autora, 2010.

¹⁰⁶ CANONICA, L; KROSCZYNSKI, W; RANZI, BM; RINDONE, B; SCOLASTICO, C.. Biosynthesis of mycophenolic acid. Journal of the Chemical Society [Section] D: Chemical Communications 6, 1971, pp. 257.

¹⁰⁷ TERASHIMA Op. Cit., p. 26

¹⁰⁸ FLÓREZ, J., ARMIJO A., y MEDIAVILLA A. Farmacología humana. 3ª ed. Masson S.A. Barcelona, 1997.

❖ Características macroscópicas

Es una colonia de color verde con amarillo (foto 35), después de los 8 días de inoculada medía entre 8 y 10 cm de diámetro. A los 5 días de inoculada se observó la formación de un disco más o menos denso en el centro de la colonia donde se encontraban la mayoría de los conidios. No se observaron pústulas.

❖ Características microscópicas

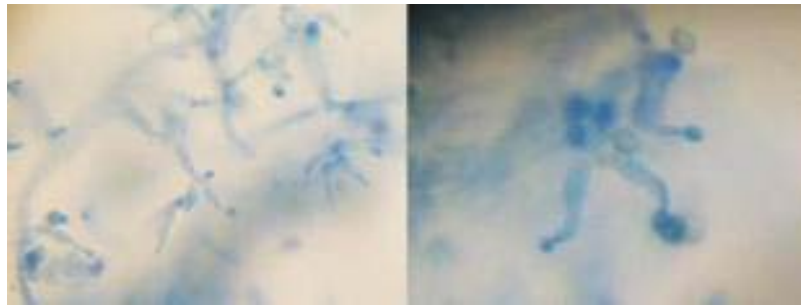


Foto 36: *T. atroviride* a la izquierda vista al microscopio (40X) y a la derecha foto ampliada. Fuente autora, 2010.

Se observaron conidióforos con ramificación unilateral y algunos presentaron ramas pares (foto 46 parte izquierda). Las ramas surgieron a 90° por encima del punto de ramificación. Se registraron fiálides cilíndricas terminadas en gancho (foto 36 parte derecha), de manera solitaria o en verticilos de 2 a 4, median entre 6,0 y 9,7 micras de largo por 2,5 y 3,5 micras de ancho, en su punto más ancho. Se observaron conidios verdes, ovoides y suaves (foto 36 parte derecha) que median entre 3,0 y 3,8 micras de ancho x 2,8 a 3,5 micras de largo.

Según las anteriores características macroscópicas y microscópicas y utilizando la clave propuesta por Samuels et al¹⁰⁹, se determinó esta especie como *T. atroviride*.

¹⁰⁹ SAMUELS et al. Op. Cit., p. 20

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

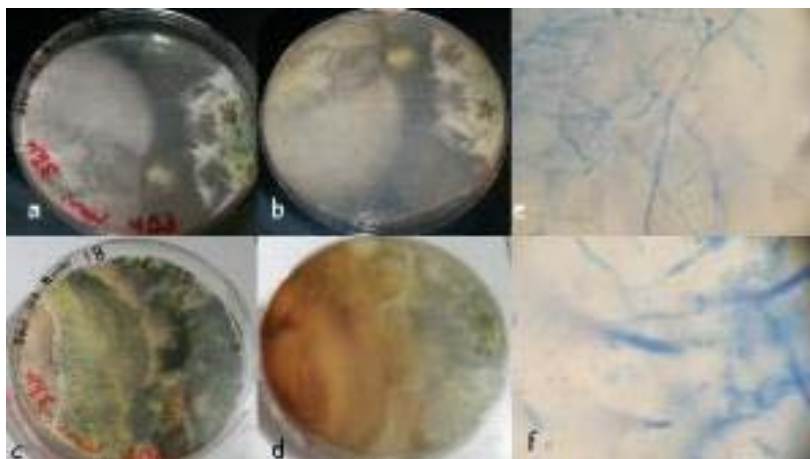


Foto 37: Cultivo de *L. edodes* (hongo blanco) vs *T. atroviride* (hongo verde): **a** y **b** anverso e inverso de las colonias a los 10 días de sembrado, **c** y **d** anverso e inverso de las colonias a los 20 días de sembrado, **e** micelio de Shiitake sin contaminantes visto al microscopio 40X, **f** micelio de Shiitake degradado por *T. atroviride*, visto al microscopio a 40X. Fuente autora 2010.

T. atroviride al ser inoculado en la cajas de petri, donde estaba creciendo previamente el Shiitake, se desarrolló rápidamente ocupando el espacio del medio de cultivo vacío (foto 37 partes a y b) y al entrar en contacto con el micelio del Shiitake lo invadió rápidamente; al cabo de 20 días (foto 37 parte c) cubría casi toda la superficie del micelio.

En el inverso de la caja de petri se observó que el micelio del Shiitake tomó una coloración marrón oscura (foto 37 parte d) posiblemente como evidencia de la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles en respuesta al ataque de *T. atroviride*.

Microscópicamente se observó el engrosamiento de las hifas, la fragmentación y un colapso en el micelio del Shiitake producido muy probablemente por la secreción de quitinasas que produce *T. atroviride* según el Joint Genome Institute (JGI)¹¹⁰.

Estos resultados dejan en evidencia el claro antagonismo entre estas dos especies. *T. atroviride* parasitó y degradó el micelio del shiitake.

El ataque de este hongo a los cultivos de Shiitake ya había sido reportado por Chet y Inbar¹¹¹ quienes afirmaron que esta especie es la causante del moho verde en los hongos comestibles atacando tanto el desarrollo del

¹¹⁰ JOINT GENOME INSTITUTE US Department of Energy *Trichoderma atroviride*. 2010. [on line] URL: <http://genome.jgi-psf.org/Triat1/Triat1.home.html> (Consulted oct. 2010)

¹¹¹ CHET, I. e INBAR J. Op. Cit., p. 25

micelio como la fructificación. Según Górski et al¹¹², constituye una amenaza considerable para la producción de setas como *A. bisporus*, *Pleurotus spp.* y *L. edodes*. Además es conocido por sus capacidades de control biológico contra una variedad de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*.

El rápido ataque al Shiitake puede ser debido a diferentes estrategias de *T. atroviride* como lo afirma el JGI¹¹³ este contaminante produce metabolitos como glucanasas, proteasas, quitinasas y antibióticos.

Kaur et al¹¹⁴ ha demostrado que *T. atroviride* secreta enzimas líticas involucradas en el parasitismo de esclerocios. Así mismo se ha demostrado que enrolla sus hifas alrededor de las hifas del hongo anfitrión, las penetra y degrada para usar su contenido celular como fuente de nutrientes.

¹¹² GORSKI R., FRUZYNSKA-JOZWIAK D., ANDRZEJAK K., SOBIERALSKI K., SIWULSKI M. The effect of selected preparations on in vitro growth of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride* found in garden mushroom (*Agaricus bisporus*) crop *Phytopatologia Polonica*, N°: 42, 2006, pp. 29-35

¹¹³ JGI Op. Cit., p. 59

¹¹⁴ KAUR J., MUNSHI G.D., SINGH R.S., KOCH E. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* y *Coniothyrium minitans*. *J. Phytopathology* 153, 2005 pp. 274-279.

7.4. Caracterización de las especies de bacterias contaminantes encontradas

7.4.1 *Sphingomonas paucimobilis*



Foto 38: *S. paucimobilis* cultivado en Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 38 la colonia es de color amarillo, redondeada y con el borde entero. Son bacilos gram negativos, móviles, catalasa positiva, oxidasa negativa y no fermentadores.

Según Altamirano y Pozzo¹¹⁵ *S. paucimobilis* inicialmente clasificada como *Pseudomonas paucimobilis* es una bacteria aeróbica que se encuentra en el suelo, el agua y en ambientes de hospital. Según Ryan et al¹¹⁶ esta bacteria puede causar brotes de bacteriemia en individuos inmunocomprometidos, se considera de importancia clínica menor, pero causa infecciones como sepsis y casos de infecciones inusuales invasoras y graves como artritis séptica y osteomielitis, pero ningún caso la muerte.

Las especies de *Sphingomonas* a menudo se han encontrado en asociación con las plantas y muchas cepas han sido aisladas de la rizosfera.

¹¹⁵ ALTAMIRANO M. y POZZO M. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental Porto Alegre, de 3 a 8 de dezembro 2000.

¹¹⁶ RYAN M, ADLEY C. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent gram-negative nosocomial infectious organism. J Hosp Infect. Jul; vol 75 N° 3: 2010, pp. 153-7.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 39: *L. edodes* (parte superior) vs *S. paucimobilis* (parte inferior) cultivados en AN, a los 10 días de inoculado. Fuente autora, 2010.

S. paucimobilis según Berg et al¹¹⁷ ha demostrado ser antagonista contra hongos fitopatógenos como *Verticillium dahliae*, pero en este estudio no exhibió antagonismo hacia *L. edodes*. En las pruebas no se observó afectación de la bacteria hacia el hongo y el Shiitake se desarrolló normalmente (foto 39).

S. paucimobilis se encontró en los dos sustratos que contenían eucalipto debido posiblemente a su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos de lignina.

7.4.2 *Aerococcus viridans*



Foto 40: *A. viridans* cultivado en Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 40 la colonia es de color amarillo, redondeada y con borde entero. Son cocos, gram positivos y no móviles. Esta bacteria se

¹¹⁷ BERG G, BALLIN G. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. J Phytopathol N°141, 1994, pp. 99-110.

caracteriza por ser catalasa negativa, oxidasa-negativa y fermentar algunos azúcares como lactosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa.

El genero *Aerococcus* se describió por primera vez en 1953. El organismo fue aislado de placas colocadas en un entorno hospitalario. Según Williams, et al¹¹⁸ es una bacteria facultativa anaerobia, ampliamente distribuida en el entorno. Christensen et al¹¹⁹ afirman que la bacteria se ha reconocido principalmente como un patógeno en humanos.

Esta bacteria ha sido reportada por Augustine et al¹²⁰ como agente causante de la meningitis infantil, infección de las vías urinarias y causante de la endocarditis infecciosa. Suele ser sensible a la penicilina y a otros antibióticos de uso común.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 41: *L. edodes* (hongo blando) vs *A. viridans* (bacteria amarilla) cultivados en AN, a los 10 días de inoculado. Fuente autora, 2010.

A. viridans en interacción con *L. edodes* permitió el crecimiento y desarrollo normal de este último, pero cuando las colonias de Shiitake son pequeñas se observó que la bacteria, penetró el micelio, lo invadió completamente y posteriormente no le permitió su crecimiento (Foto 41).

Estos resultados reflejaron un antagonismo entre estas dos especies el cual no había sido reportado.

¹¹⁸ WILLIAMS, R. E. O., A. HIRCH, and COWAN S. T. *Aerococcus*, a new bacterial genus. J. Gen. Microbiol. 8, 1953, pp. 475–480.

¹¹⁹ CHRISTENSEN, J. J., KORNER, B. & KJAERGAARD, H. *Aerococcus*-like organisms—an unnoticed urinary tract pathogen. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97, 1989, pp. 539-46.

¹²⁰ AUGUSTINE T, THIRUNAVUKKARASU, BHAT BV, BHATIA BD.. *Aerococcus viridans* endocarditis. Case report. Indian Pediatr; N°31, 1994, pp. 599-601

7.4.3 *Agrobacterium tumefaciens*



Foto 42: *A. tumefaciens* cultivada en Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 42, la colonia es de color amarillo, borde entero, forma circular y lisa. Son bacilos gram-negativos, móviles y se caracterizan por poseer actividad catalasa, oxidasa, ureasa, nitrato reductasa y β -galactosidasa. Esta bacteria produce ácido en el medio basal con arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa y lactosa.

Pertenece a las Proteobacterias, a la subdivisión alfa, al grupo Rhizobiaceae, a la familia Rhizobiaceae, al género *Agrobacterium*, no es productora de esporas y se transmite por el suelo.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 43: *L. edodes* (hongo blando) vs *A. tumefaciens* (bacteria amarilla) cultivados en AN: a los 10 días (parte izquierda) y 15 días de inoculado (parte derecha). Fuente autora, 2010.

Se observó que *A. tumefaciens* se extiende hacia el micelio de *L. edodes* llegando a rodearlo a los 15 días (Foto 43). El micelio del Shiitake se desarrolló muy bien y no se observó afectación de la bacteria sobre el micelio del hongo.

En un estudio realizado por Barron¹²¹ se observó que los hongos lignícolas como *Agaricus brunnescens*, *Coprinus quadrifidus* y *Lepista nuda*, pueden atacar a microcolonias de *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas pulida* para utilizarlas como fuente de carbono en su crecimiento.

Es probable que este fenómeno este ocurriendo también con el Shiitake, pues *A. tumefaciens* es una bacteria que fue hallada en el sustrato de eucalipto-Bogotá en todas las etapas de desarrollo acompañando al micelio del Shiitake. Según los resultados, esta bacteria no perjudicó el desarrollo del Shiitake, al contrario el micelio se desarrolló bien en el agar nutritivo, un medio muy utilizado para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en requerimientos nutritivos.

Es muy probable que *L. edodes* pueda degradar las paredes de las microcolonias de *A. tumefaciens* para utilizarlas como fuente de carbono teniendo en cuenta que, según Barron¹²² el ataque a colonias de bacterias parece ser un fenómeno generalizado entre los basidiomicetos que se alimentan de los principales componentes de la madera.

7.4.4 *Micrococcus spp.*



Foto 44: *Micrococcus spp.*, cultivado en Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 44, la colonia es color crema, circular y lisa. Son cocos, gram positivos y móviles. Se caracterizan por ser catalasa positivos, oxidasa negativos y con escasa o nula producción de ácido.

Según Altamirano y Pozzo¹²³ el género *Micrococcus* fue previamente aislado a partir de suelos contaminados con petróleo de una refinería y reportado por su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. Así mismo se ha descrito la capacidad de este género de vivir en altas concentraciones

¹²¹ BARRON, G. Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi. Can. J. Bot. 66, 1988, pp. 2505-2510.

¹²² *Ibíd.* p 65

¹²³ ALTAMIRANO y POZZO *Op. Cit.*, p. 61

de petróleo así como la de degradar otros compuestos orgánicos como el malatión.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 45: *L. edodes* vs *Micrococcus* sp cultivados en AN, a los 10 días de inoculado. Fuente autora, 2010.

Micrococcus spp. Se sembró junto con al sembrarse junto con *L. edodes* y ocurrió lo mismo que con *A. tumefaciens*. Esta bacteria rodeó el micelio del hongo pero no lo dañó y el micelio se desarrolló normalmente.

Micrococcus spp. no presentó antagonismo ante el Shiitake ni mostró ser patógeno. Podría ocurrir lo mismo que con *A. tumefaciens* que sean aprovechadas por el Shiitake para suplir deficiencias en nutrientes.

7.4.5 *Burkholderia* sp.

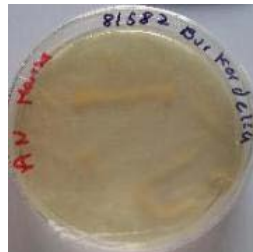


Foto 46: *Burkholderia* spp., cultivada en AN. Fuente autora, 2010.

La colonia de la bacteria es de color crema, con márgenes convexos y regulares (foto 46), son bacilos gram-negativos, móviles, caracterizados por la producción de catalasa, oxidasa y ureasa, es indol negativa y no fermenta la lactosa.

Pickering¹²⁴ afirma que el género *Burkholderia* fue propuesto en 1992 y se conformó por 7 especies que antes estaban clasificadas como *Pseudomonas*. Pertenece a la subdivisión de las Proteobacterias y ocupan una gama sorprendente de nichos ecológicos incluyendo el suelo, el agua, la rizosfera, los animales, y los seres humanos.

Según Stoyanova, et al¹²⁵ las especies de *Burkholderia* son principalmente saprofitos del suelo con la excepción de *B. mallei* y *B. pseudomallei*, pero algunas especies hacen simbiosis con las plantas y los hongos.

En un estudio realizado por Piyush et al¹²⁶ demostraron que *Burkholderia* spp. secreta una fitohormona la ACC deaminasa que promueve el crecimiento de las plantas, solubiliza el fosfato y es antagónica contra los fitopatógenos.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 47: *L. edodes* vs *Burkholderia* sp cultivados en AN, a la izquierda los 5 días de inoculado a la derecha a los 15 días de inoculado. Fuente autora, 2010.

Al cabo de los 15 días de sembrada *Burkholderia* spp. en la caja de petri, se observó una ligera degradación del micelio de *L. edodes* en la parte externa

¹²⁴ PICKERING LK. Red book (Report of the committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics): *Burkholderia cepacia*. 25th ed. Elk Grove Village, IL: APP; 2003, pp. 224-5.

¹²⁵ STOYANOVA, M., PAVLINA, I., MONCHEVA, P., Y BOGATZEVSKA, N.. Biodiversity and Incidence of *Burkholderia* Species. Biotechnol. & Biotechnol. Eq vol 21 N° 3, 2007, pp. 306-310.

¹²⁶ PIYUSH PANDEY, S. KANG C. AND MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. CURRENT SCIENCE, vol. 89, N° 1, 10 July 2005.

de la colonia (foto 47). Posteriormente el micelio del hongo no creció más pero tampoco se redujo, se mantuvo estable hasta que el cultivo se secó.

La lisis del micelio del Shiitake por cepas de *Burkholderia* ha sido reportada en un estudio realizado por Ogawa et. al,¹²⁷ quienes aislaron de las setas del Shiitake una cepa de *Burkholderia cepacia* KH2 capaz de secretar una enzima quitinasa que hidrolisa la quitina y forma N-acetilquitinooligosacaridos. Adicionalmente inocularon *Burkholderia spp.* en primordios de shiitake y se observaron al cabo de los 15 días, pudrición en la parte donde el primordio fue inoculado (Foto 48).



Foto 48: Primordio de *L. edodes* inoculado con *Burkholderia spp.*, parte izquierda a los 5 días parte derecha a los 15 días. Fuente autora, 2010.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gill et al¹²⁸ quienes analizando otra cepa de esta bacteria, la "*Burkholderia gladiolos pv. Agaricicola*" encontraron que causa los síntomas de la podredumbre blanda en un número de hongos comercialmente importantes tales como *L. edodes*, *P. ostreatus*, *Velupies flammulina*, *Nameko pholiota*, *Hypsizygus marmoreus* y *Frondos grifola* en Japón y en diferentes especies de *Agaricus spp.*, cultivadas en Nueva Zelanda y Europa. Caracterizaron esta especie como un patógeno importante en la industria de los hongos comestibles.

¹²⁷OGAWA K, YOSHIDA N, KARIYA K, OHNISHI C, IKEDA R. Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinus edodes*, Shiitake mushroom. J Gen Appl Microbiol. 2002 Feb Vol 48 N°1 2002, pp. 25-33.

¹²⁸ GILL, W. M., and TSUNEDA A. The interaction of soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricicola* with Japanese cultivated mushrooms. Can. J. Microbiol. 43, 1997, pp. 639–648.

Esta bacteria fue aislada de una caja de petri donde creció el Shiitake y el *T. crassum*. Se observó que al pasar los días se degradó el micelio de *T. crassum*; por esta razón se hicieron pruebas donde se pusieron en la misma caja de petri el Shiitake, la *Burkholderia* y las diferentes especies de *Trichodermas* (Foto 49). Se encontró que la bacteria logró degradar el micelio y detuvo el crecimiento de *T. crassum* en la zona donde fue inoculada la bacteria, pero al cabo de 20 días, este hongo invadió toda la caja de petri. *Burkholderia* no inhibió del crecimiento de las otras especies de *Trichodermas* encontradas.

Según Kang et al¹²⁹ *Burkholderia spp.*, ha demostrado poseer un compuesto anti-hongos identificado con su nombre en inglés como 2-Hydroxymethylchroman-4-one, el cual muestra una buena actividad contra fitopatógenos tales como *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotinia sclerotiorum*. En este ensayo se logró detener por un tiempo el desarrollo del *T. crassum* sin afectar en mayor grado el micelio de *L. edodes*.

Realizando más estudios y modificando esta bacteria podría servir como un controlador biológico de esta especie de *Trichoderma* sin afectar el desarrollo del Shiitake.



Foto 49: *L. edodes* a la izquierda vs *Burkholderia spp.*, en el centro y *T. crassum* a la derecha los 10 días de cultivados en PDA. Fuente autora, 2010.

¹²⁹ KANG Op. Cit., p. 27

7.4.6 *Bacillus brevis*



Foto 50: *B. brevis* cultivado en AN. Fuente autora, 2010.

Como se muestra en la foto 50, la colonia es de color crema con forma irregular y se esparció por todo el medio de cultivo en forma de espiral. Son bacilos gram-positivos, móviles y se caracterizan por ser catalasa positivos, amilasa negativos, caseína negativos e indol negativos.

Según Udaoka¹³⁰ *B. brevis* es un organismo aeróbico formador de esporas que se encuentra comúnmente en el suelo, aire, agua y materia en descomposición. Esta bacteria utiliza el citrato y rara vez se asocia con enfermedades. Los antibióticos gramicidina y tirocidina se aislaron por primera vez de este organismo.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake



Foto 51: *L. edodes* vs *B. brevis* cultivados en AN, los 10 días de inoculado. Fuente autora, 2010.

Al inocular *B. brevis* en la caja de petri donde estaba creciendo *L. edodes* se observó una zona de inhibición entre el sitio donde se sembró la bacteria y donde estaba sembrado el hongo. Con el paso de los días se registró la degradación del micelio del Shiitake (Foto 51).

¹³⁰ UDAKA S. Screening for Protein-producing Bacteria. Agric. Biol. Chem. 40, 1976, pp. 523-528

En un estudio realizado por Ishikawa et al¹³¹ reportaron la inhibición de *B. brevis* por parte de *L. edodes*. Evidenciaron como una cepa de *L. edodes* obtenida en Brasil presentó actividad inhibitoria a 35 bacterias evaluadas entre ellas *B. brevis*.

En este trabajo se obtuvo un resultado diferente, fue *B. brevis* quien no permitió el desarrollo del Shiitake y lo degradó. Esto pudo deberse a que se utilizó como medio de cultivo Agar nutritivo, un medio en el que la bacteria se desarrolló mejor que el hongo y eso favoreció el crecimiento de la bacteria y el debilitamiento del hongo. Se evidenció antagonismo de la bacteria hacia el hongo.

7.4.7 *Bacillus cereus*



Foto 52: *B. cereus* cultivado en AN. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 52, las colonias son de color crema, de forma irregular y llegan a cubrir toda la superficie de la caja de petri como una sola capa. Son bacilos gram positivos que se caracterizan por ser catalasa positivos, tirosina positivos, glucosa positivos y reducir el nitrato.

Según el Bacteriological Analytical Manual¹³² *B. cereus* es de la familia *Bacillaceae*, es un organismo aerobio y anaerobio facultativo, móvil, saprofito y esta ampliamente distribuido en el ambiente natural, en suelos, en el polvo y en el aire; por lo tanto tiene una mayor oportunidad para estar presente en o sobre los alimentos. Crece a temperaturas normales entre 15°C a 20°C y a máxima temperatura entre 40°C a 45°C. Generalmente posee flagelos peritricos y antígenos somáticos flagelares y de esporas.

¹³¹ ISHIKAWA Op. Cit., p. 29

¹³² BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. Chapter 14 *Bacillus cereus* January. 2001. [on line] URL: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070875> (Consulted july. 2010).

Produce dos enterotoxinas durante su crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria.

❖ **Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake**

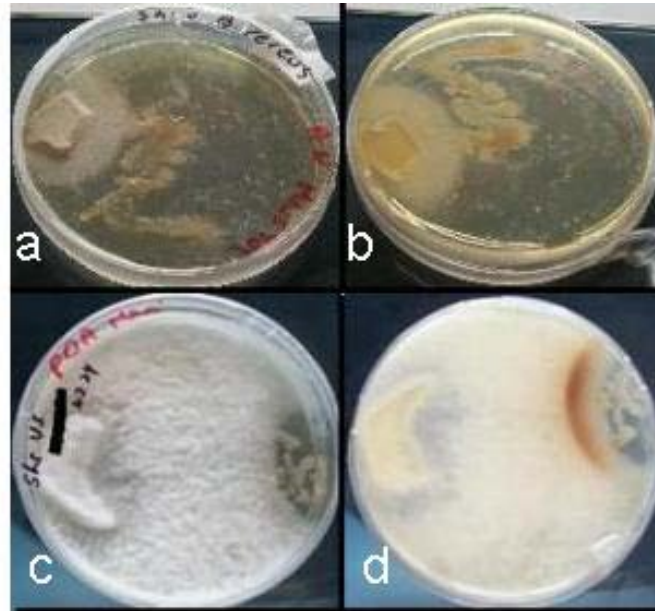


Foto 53: *L. edodes* vs *B. cereus* a los 10 días de inoculados, cultivados en AN: parte a y b y en PDA, partes c y d. A la izquierda anverso de las colonias a la derecha inverso de las colonias. Fuente autora, 2010.

Al inocular *B. cereus* con *L. edodes* en medio de cultivo AN no se observó afectación del micelio del hongo por parte de la bacteria (foto 53 partes a y b). Al ser cultivados en PDA se observó que el micelio del Shiitake se desarrolló bien en toda la caja de petri, pero al entrar en contacto con la bacteria no pudo desarrollarse más. Se formó una zona de demarcación color marrón entre el micelio y la bacteria (foto 53 partes c y d). Esta zona marrón ya se había observado en *L. edodes* en respuesta antagónica a las especies de *Trichoderma* encontradas. Según Savoie y Mata¹³³ se debe a la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles en respuesta de *L. edodes* frente al ataque que en este caso sería de la bacteria.

¹³³ SAVOIE and MATA Op. Cit., p. 34

En un estudio realizado por Pacumbaba et al¹³⁴ demostraron que el lixiviado del micelio de *L. edodes* puede inhibir el crecimiento de *B. cereus* indicando que el micelio de shiitake contiene ingredientes antibióticos contra esta especie bacteriana. Así mismo, Ishikawa et al¹³⁵ reportaron que *L. edodes* produce metabolitos con actividad inhibitoria hacia *B. cereus* entre otras bacterias que presenta una alta sensibilidad a estos compuestos.

Con estos resultados se aprecia antagonismo entre las dos especies. *B. cereus* no permitió el desarrollo del micelio del *L. edodes* en la zona donde se inoculó, pero fue controlado por sustancias producidas por este.

7.4.8 *Klebsiella oxytoca*



Foto 54: *K. oxytoca* cultivada en Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Como se observa en la foto 54 las colonias son de color crema y de forma circular que aparece como pequeños puntos en toda la caja de petri. Son bacilos gram-negativos, no móviles y se caracterizan por ser lisina positivo, indol positivos, citrato positivos.

Según Podschun et al¹³⁶ *K. oxytoca* es una bacteria anaeróbica facultativa que se transmite fácilmente y posee una capacidad de colonizar una amplia variedad de especies incluido el hombre, por ello ha sido reconocida por su importancia clínica. Posee resistencia a los β -lactámicos como la cefotaxima,

¹³⁴ PACUMBABA, R. P., BEYL, C. A., AND PACUMBABA, R. O., Jr. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. Plant Dis. 83 1999, pp.20-23.

¹³⁵ ISHIKAWA Op. Cit., p. 29

¹³⁶ PODSCHUN, R. Y U. ULLMANN. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11: 1998, 589-603.

ceftazidima y el aztreonam monobactam. Hansen et al¹³⁷ afirman que se puede encontrar en aguas superficiales, aguas residuales, el suelo y en las plantas.

❖ **Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake**



Foto 55: *L. edodes* vs *K. oxytoca* cultivados en AN, a la izquierda a los 5 días de sembrada a la derecha a los 15 días de sembrada. Fuente autora, 2010.

K. oxytoca invadió el micelio de *L. edodes*, le restringió su crecimiento y lo degradó llegando a desaparecerlo en 15 días (foto 55).

Según estos resultados *K. oxytoca* posee una gran capacidad antagónica hacia el Shiitake. Casos reportados de antagonismos de esta bacteria hacia los hongos son pocos. Lam et al¹³⁸ afirman que *K. oxytoca* junto con otras especies de bacterias viven en los huevos de la mosca doméstica y cuando estos eclosionan contribuye a suprimir el crecimiento de los hongos que compiten por el alimento con las larvas de la mosca.

¹³⁷ HANSEN D, AUUCKEN H, ABIOLA T, PODSCHUN R: Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. J Clin Microbiol 42: 2004, pp. 3665-9.

¹³⁸ LAM K, THU K, TSANG M, MOORE M, GRIES G. Bacteria on housefly eggs, *Mosca* doméstica, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. Naturwissenschaften. Sep;96(9) 2009, pp.1127-32.

7.4.9 *Enterobacter aerogenes*



Foto 56: *E. aerogenes* cultivado en cultivo Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

Son colonias de color crema, circulares y de borde liso (Foto 56). Son bacilos gram negativos que se caracterizan por ser oxidasa negativos, catalasa positivos, citrato positivos e indol negativos. Es una especie cosmopolita, se encuentra en el suelo, agua, alimentos y es patógena de animales y de seres humanos.

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

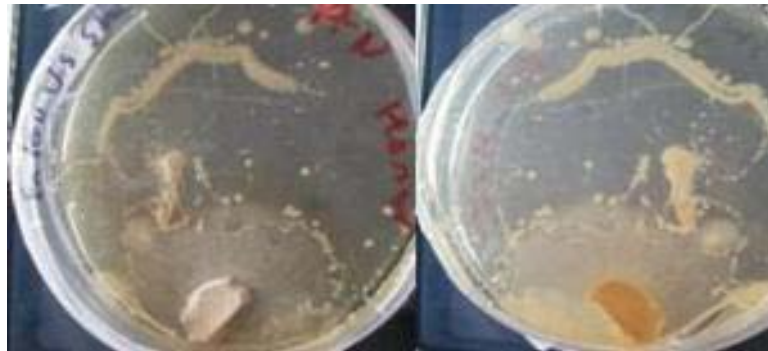


Foto 57: *L. edodes* vs *E. aerogenes* cultivados AN, a la izquierda inverso de las colonias a la derecha inverso de las colonias. Fuente autora, 2010.

En las cajas de petri donde se sembró *E. aerogenes* y *L. edodes* se observó el crecimiento de la bacteria entorno al micelio del hongo rodeándolo y se observó la degradación del micelio tornándose cristalino. Según estos resultados *E. aerogenes* mostró ser una especie antagónica del Shiitake.

El antagonismo de *E. aerogenes* hacia otros hongos ya había sido reportado. Chernin et al¹³⁹ evidenciaron el antagonismo de la cepa B8 de *E. aerogenes* hacia *Phytophthora cactorum* pues observaron que la bacteria redujo significativamente las infecciones de la corona de manzana y pudrición de la raíz causada por este hongo.

7.4.10 *Stenotrophomonas maltophilia*

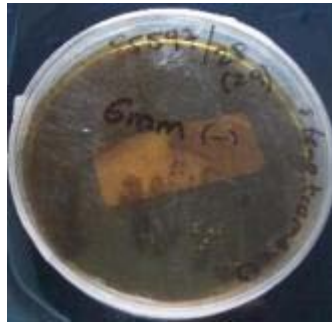


Foto 58: *S. maltophilia* cultivada cultivo Agar Sangre. Fuente autora, 2010.

La colonia es de color crema, de forma irregular y de borde liso (Foto 58). Son bacilos gram negativos, móviles y se caracterizan por ser oxidasa negativos, glucosa y maltosa positivos y lisina positivos.

Según Cristal et al¹⁴⁰ es una bacteria aerobia, de metabolismo oxidativo, poco exigente, generalmente no hemolítica y de olor característico a amoníaco. De baja patogenicidad, cuyo hábitat natural es el ambiente acuático. Antiguamente clasificada dentro de los géneros *Pseudomonas* (1961) y *Xanthomonas* (1983). En 1993, se proponen dentro de un nuevo género llamado *Stenotrophomonas*.

¹³⁹ CHERNIN L, ISMAILOV Z, HARAN S, CHET I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1995, pp. 1720–1726.

¹⁴⁰ CHRYSTAL J. y FERNÁNDEZ A. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev. chil. infectol.* v.23 n.3 Santiago sep. 2006, pp. 247-248. [on line] URL: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v23n3/art09.pdf> (Consulted sept. 2010).

❖ Pruebas *in vitro* de antagonismo con Shiitake

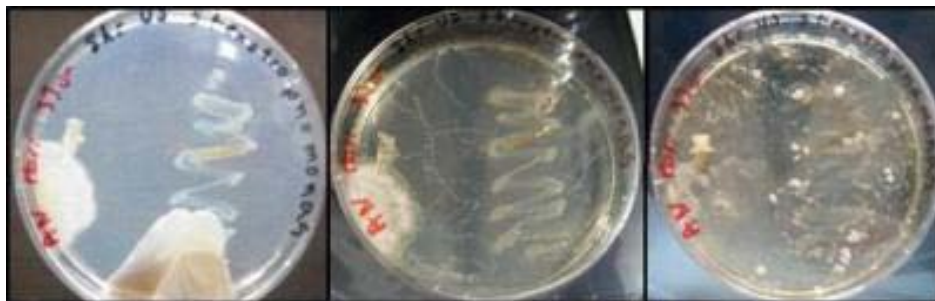


Foto 59: *L. edodes* vs *S. maltophilia* cultivados en AN: a la izquierda los 5 días, en el centro a los 10 días y a la derecha a los 20 días de sembrada. Fuente autora, 2010.

Las pruebas con *S. maltophilia* vs *L. edodes* dieron como resultado el crecimiento de las colonias de bacterias, las cuales al entrar en contacto con el micelio del Shiitake lo destrozaron llegando a desaparecerlo por completo después de los 20 días (Foto 59).

Según Kobayashi et al¹⁴¹ la lisis enzimática de las paredes celulares de los hongos a través de quitinasas extracelulares es uno de los mecanismos de control biológico ejercidos por cepas de *S. maltophilia* y esto se evidenció claramente con el micelio del Shiitake, pues al estar en contacto con la bacteria esta lo degrado en su totalidad.

El antagonismo de *S. maltophilia* hacia otros hongos ya había sido reportado. Kai et al¹⁴² lo señalan como antagonista de *Rhizoctonia solani*. Zhang et al¹⁴³, muestran su antagonismo hacia *Bipolaris sorokiniana* y Dunne et al¹⁴⁴, demostraron como la cepa W81 de *S. maltophilia*, aislada de la rizosfera de remolacha azucarera produjo las enzimas extracelulares quitinasa y proteasa que inhibieron el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos como *Pythium ultimum*.

¹⁴¹ KOBAYASHI, D. GUGLIEMONI, M., and CLARKE, B. B. Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1995, pp. 1479-1487.

¹⁴² KAI et al Op. Cit., p 30

¹⁴³ ZHANG et al Op. Cit., p 29

¹⁴⁴ DUNNE et al Op. Cit., p 29

7.5 Análisis de la relación existente entre el tipo de sustrato y las especies de hongos encontradas.

Se realizó la prueba estadística Chi-cuadrado con $(k-1)(n-1)=(12-1)(3-1)=22$ grados de libertad donde k es el número de especies de hongos y n el número de sustratos.

Para este conjunto de datos la suma de las inercias fue de 1.5899 que multiplicada por el total de observaciones (55) da como resultado 87.4445. Con un nivel de confianza del 99%, se rechaza la hipótesis nula de independencia entre las especies de hongos y los sustratos donde fueron tomadas las muestras.

Elaborando una proyección geométrica de los datos (gráfica 7) con el análisis de correspondencias simples se observó que los puntos que representan las especies de los hongos se agruparon de manera muy definida en torno a alguno de los tres tipos de sustrato; lo cual ratifica el rechazo de la hipótesis de independencia entre las especies de hongos y los sustratos utilizados, pues si los datos fueran independientes, todos los puntos se concentrarían alrededor del centro de gravedad (punto 0,0).

La gráfica 7 permite ver como en el factor 1 se separan las especies encontradas en eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama de las especies encontradas en eucalipto-salvado de trigo-Bogotá.

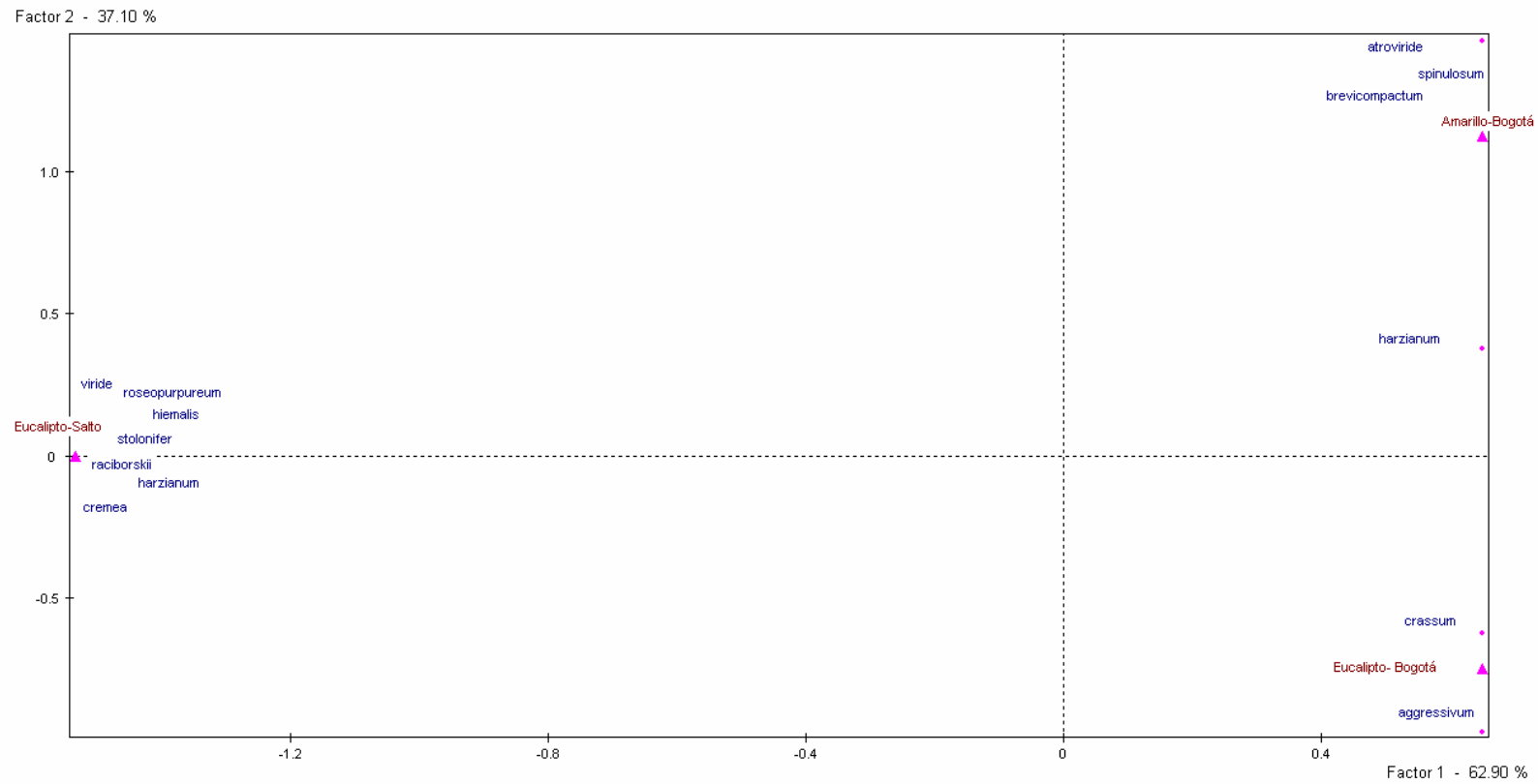
La distancia observada puede deberse a la composición de los diferentes sustratos. El primero esta compuesto por eucalipto y complementado con cascarilla de arroz y el otro esta compuesto de eucalipto y complementado con salvado de trigo; lo que podría explicar los resultados. Además, la distancia también puede ser atribuida al ambiente en el que se desarrollo el cultivo.

Se observa en la segunda dimensión o factor 2, la lejanía existente entre las especies encontradas en el aserrín de amarillo-Bogotá con las encontradas en los otros dos sustratos. La distancia con el sustrato de eucalipto-salvado de trigo-Bogotá podría deberse a la diferencia en la composición de los sustratos, ya que estos dos sustratos se trabajaron en la empresa Bogotana con las mismas condiciones ambientales y de producción.

La distancia con el sustrato de eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama puede ser atribuida a la diferencias en la composición de los sustratos y al ambiente en el que se desarrollaron.

La única especie de hongo que no tiene un sustrato definido es el *T. harzianum* que se encuentra entre el sustrato amarillo-salvado de trigo-

Bogotá y el sustrato eucalipto salvado de trigo-Bogotá. Esto cobra mucho sentido observando que es muy similar la frecuencia en la que esta especie de hongo está presente en estos dos tipos de sustratos. Excluyendo a eucalipto-cascarilla de arroz-Salto del Tequendama se podría decir que esta especie de hongo es indiferente del sustrato donde se tomó la muestra.



Gráfica 7: Análisis de Correspondencias Simples entre el tipo de sustrato utilizado y las especies de hongos presentes en estos.

7.6 Análisis de la relación existente entre el tipo de sustrato y las especies de bacterias encontradas

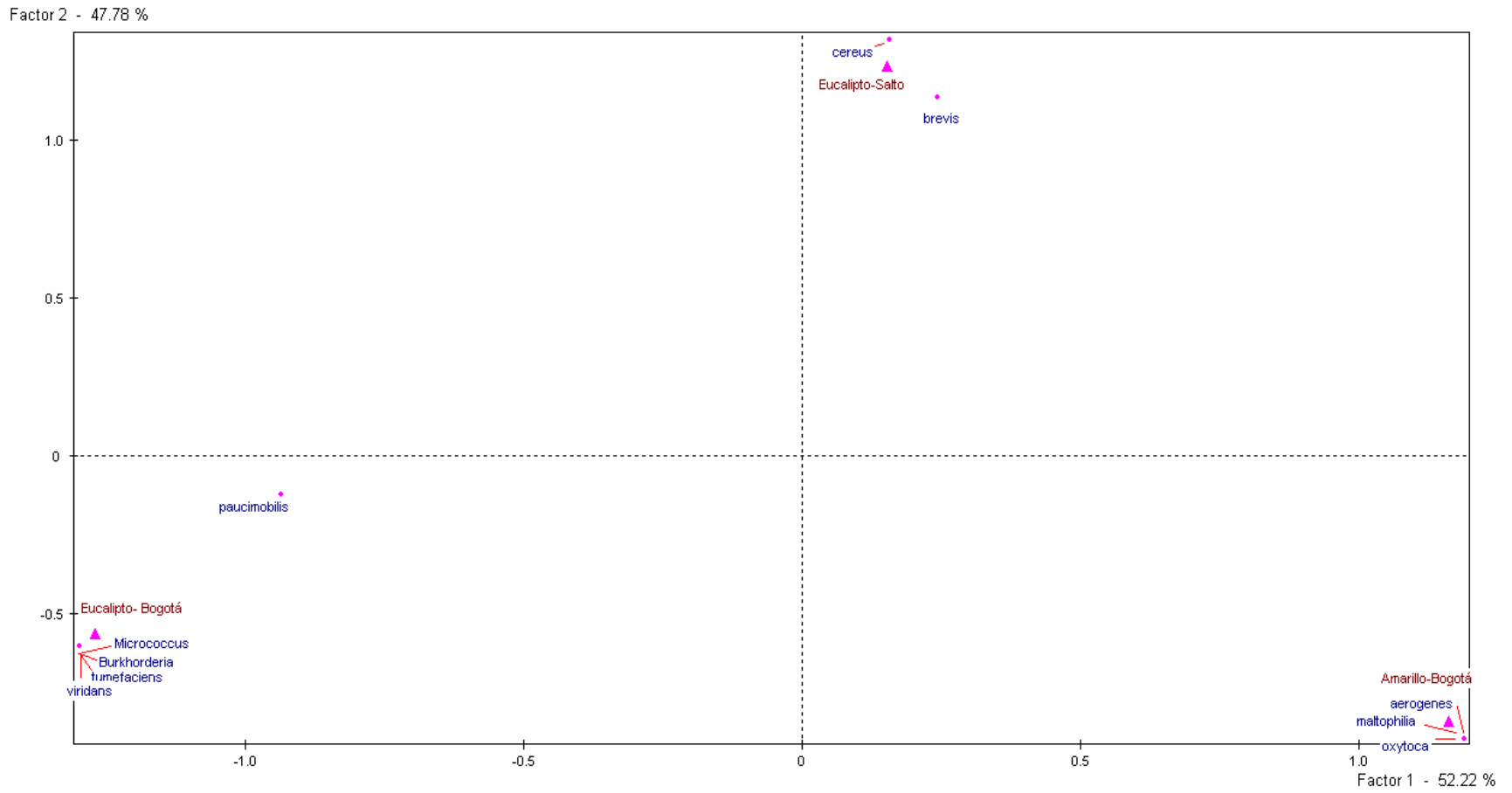
Según la prueba estadística Chi-cuadrado con 18 grados de libertad para este conjunto de datos la suma de las inercias es 1.5899 que multiplicada por el total de observaciones (58) da como resultado 87.4445. Así con un nivel de confianza del 99% se rechazaría la hipótesis nula de independencia entre las especies de bacterias y el lugar donde son tomadas las muestras.

Elaborando una proyección geométrica de los datos con el análisis de correspondencias simples (gráfica 8) se observa como los puntos que representan las especies de bacterias al igual que lo ocurrido con las especies de hongos se agrupan de manera muy definida entorno a alguno de los tres tipos de sustratos.

La gráfica 8 reafirma el rechazo de la hipótesis de independencia y permite observar como en el factor 1 existe una distancia entre las especies encontradas en el sustrato eucalipto-salvado de trigo-Bogotá con las especies encontradas en amarillo-salvado de trigo-Bogotá. La lejanía entre las especies encontradas en estos dos sustratos puede ser debida a la composición de los mismos pues como se mencionó anteriormente estos dos sustratos se trabajaron en la misma empresa con las mismas condiciones ambientales y de manejo.

En el factor 2 se observa el distanciamiento entre las especies encontradas en el sustrato del Salto del Tequendama con las encontradas en la empresa Bogotana. Esta distancia puede deberse al ambiente en la planta en el que se desarrollaron las muestras y a la diferente composición entre los sustratos, esto se ratifica al observar una mayor cercanía entre las especies de los dos sustratos de la empresa Bogotana que entre las especies de los dos sustratos que contienen aserrín de eucalipto a pesar de compartir la misma base del sustrato.

Para la mayoría de las especies de bacterias, la independencia es claramente rechazada, pues se ven asociadas cada una a un solo tipo de sustrato. Pero para las especies *S. paucimobilis* y *B. brevis* no existe un sustrato definido, pues se encontraron en dos sustratos cada una. Parece ser que para estas especies es indiferente el sustrato donde se haya tomado la muestra.



Gráfica 8: Análisis de Correspondencias Simples entre el tipo de sustrato utilizado y las especies de bacterias presentes en estos.

7.7 Consideraciones Finales

Los resultados anteriormente reportados muestran como existe una estrecha relación entre el tipo de contaminante encontrado y el tipo de sustrato donde fue hallado. Estos sustratos son una mezcla de distintas sustancias orgánicas e inorgánica que tienen un alto valor nutritivo para un gran número de microorganismos a los cuales pueden acceder sin dificultad, si no se realiza una esterilización adecuada lo más probable es que los microorganismos y sus propágulos, que se encuentran naturalmente en ellos, terminen invadiendo la totalidad del sustrato de cultivo a una velocidad de crecimiento mayor que el Shiitake.

Por todo lo anterior es probable es que los organismos contaminantes estén resistiendo la esterilización y que esta no se este realizando de manera adecuada por ello es indispensable que estos sustratos sean sometidos a un adecuado tratamiento físico o químico que elimine la carga de microorganismos contaminantes.

Además es necesario mejorar y el manejo sanitario que se este dando en los cultivos, revisar que no se este ingresando a los cuartos de cultivo de sustrato gastado, el personal tenga los implementos de trabajo adecuados y mantenga la mayor asepsia posible en el manejo de los equipos y las bolsas de cultivo, revisar que no exista contaminación en los equipo empleados, o se propague contaminación por la transferencia de bolsas entre los cuartos de cultivo sin una higiene adecuada.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se encontró una leve influencia de las etapas de desarrollo de *L. edodes* con los diferentes tipos de hongos contaminantes; se observó que en las etapas de micelio y ampolla estaban presentes especies de *Penicillium* en dos de los sustratos y se observó además que en las dos últimas etapas se presentaron más especies de *Trichoderma* que de las otras especies.
- ❖ No es marcada la influencia de las etapas de desarrollo de *L. edodes* con el tipo bacterias contaminantes, se observa en cada uno de los sustratos la tendencia a presentar las mismas especies de bacterias en todas las etapas de desarrollo.
- ❖ El cambio en las condiciones de cultivo en la última etapa de desarrollo (brownig y fructificación) influyó en la microbiota contaminante; se observó la dominancia de las especies *T. aggressivum* en el sustrato eucalipto- salvado de trigo (Bogotá) y *T. viride* en el sustrato eucalipto- cascarilla de arroz (Salto del Tequendama) que presentaba baja frecuencia en las etapas anteriores. En el caso de las bacterias se registró una tendencia a la disminución de estas en esta etapa de desarrollo.
- ❖ De las especies de hongos contaminantes encontradas: *T. crassum*, *T. aggressivum*, *T. atroviride*, *P. roseopurpureum*, *P. raciborskii*, *P. brevicompactum*, *C. cladosporoides* y *R. stolonifer* presentaron antagonismo hacia *L. edodes* y actuaron como competidores del Shiitake, *T. harzianum* y *T. viride* mostraron ser parásitos para el Shiitake, *H. cremea* y *P. roseopurpureum* mostraron un leve antagonismo hacia el Shiitake y *P. spinulosum* no presentó ninguna respuesta antagónica hacia el Shiitake.
- ❖ En la interacción *in vitro* de cada una de las especies de *Trichodermas* se observó la formación de una zona de demarcación color marrón oscuro entre los micelios de los hongos que ha sido reportada por Savoie y Mata en 1998, 1999 y 2001 como evidencia de la producción de lacasas y la oxidación de polifenoles de *L. edodes* en respuesta al ataque de *Trichoderma* spp.

- ❖ Las especies de bacterias contaminantes *S. paucimobilis*, *Micrococcus spp.* y *A. tumefaciens* no mostraron antagonismo hacia *L. edodes*. *Micrococcus sp* y *A. tumefaciens* es probable que puedan estar siendo degradadas por *L. edodes* para utilizarlas como fuente de nutrientes. *A. viridans* exhibió un leve antagonismo hacia *L. edodes* cuando las colonias de Shiitake eran aún pequeñas. Las especies *Burkholderia sp*, *B. brevis*, *K. oxytoca* *E. aerogenes* y *S. maltophilia* mostraron ser especies antagónicas del Shiitake degradando el micelio del hongo. Y por último *B. cereus* no permitió el desarrollo del micelio del Shiitake en la zona donde se inoculó pero fue controlado por sustancias producidas por éste.

- ❖ Según los resultados de la prueba Chi-cuadrado y el análisis de correspondencias simples, existe dependencia entre las especies de hongos y bacterias contaminantes y el tipo de sustrato donde fueron encontradas. Las especies *T. harzianum*, *S. paucimobilis* y *B. brevis* fueron las únicas especies de contaminantes que no exhibieron un sustrato definido.

9. RECOMENDACIONES

- ❖ Revisar y mejorar la esterilización de los sustratos para matar todo organismo que pueda contaminar el cultivo y fortalecer las medidas sanitarias del personal que trabaja en la planta, para el ingreso a los cuartos de cultivo y en el manejo de los equipos empleados.
- ❖ Realizar nuevos estudios sobre la influencia de las etapas de desarrollo de *L. edodes* en el tipo de organismos contaminantes, utilizando más de dos sustratos en una misma empresa y además que se utilicen los mismos sustratos en empresas ubicadas en regiones con diferentes condiciones ambientales.
- ❖ Complementar la identificación de los hongos y las bacterias con técnicas moleculares, para lograr una identificación más completa.
- ❖ Estudiar a mayor profundidad y evaluar la cepa de *Burkholderia sp* como posible biocontrolador de especies de *Trichoderma spp.*
- ❖ Estudiar más detalladamente las relaciones entre las especies antagonicas reportadas y *L. edodes* con el fin de proponer medidas de control de la contaminación por estos organismos en cultivos de shiitake.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ABADI, K. Novel plant bio-protectants based on *Trichoderma spp.* strains with superior characteristics. Dottorato thesis, Università degli Studi di Napoli "Federico II". 2008
2. AH. CHEE, A. Basidiomycete wood decay fungi from *Pinus radiata*: biology and biological control. Thesis, Doctor of Philosophy. Lincoln University 2001. [on line] URL: <http://researcharchive.lincoln.ac.nz/dspace/handle/10182/1893> (Consulted sept. 2010).
3. ALLEGRUCCI, N; CABELLO, M; CAZAU, C. Análisis de las Comunidades de microhongos de la hojarasca de *Scutia Buxifolia* (Rhamnaceae) En el este de la provincia de Buenos Aires, Argentina. DARWINIANA 43 (1-4), 2005, pp. 1-9.
4. ALTAMIRANO M. y POZZO M. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburofílicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental Porto Alegre, de 3 a 8 de dezembro 2000.
5. ANDRADE G. Determinación de la eficacia en laboratorio de una pintura en mezcla con preservante antimancha, para madera aserrada de *Pinus radiata*. Trabajo de Titulación presentado como parte de los requisitos para optar al Título de Ingeniero Forestal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Valdivia Chile 2002. [en línea] URL: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fifa553d/doc/fifa553d.pdf> (Consultado septiembre 2010)
6. ARYA A. and ARYA C. Production of Shiitake Mushroom on Tree Waste. XII World Forestry Congress. Québec Canada 2003. [on line] URL: <http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/WFC/XII/0881-B2.HTM> (Consulted sep. 2010).
7. AUGUSTINE T, THIRUNAVUKKARASU, BHAT BV, BHATIA B. *Aerococcus viridans* endocarditis. Case report. Indian Pediatr; N°31, 1994, pp. 599-601
8. BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. Chapter 14 *Bacillus cereus* January. 2001. [on line] URL: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070875> (Consulted july. 2010).

9. BADHAM E., Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia*.83: 1991, pp. 455-463.
10. BARRON, G. Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi. *Can. J. Bot.* 66, 1988, pp. 2505-2510.
11. BERG G, BALLIN G. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliaehis* Kleb. *J Phytopathol* N°141, 1994, pp. 99-110.
12. B. RAPER, K. and THOM, C. A Manual Of The Penicillia. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, United States of America. 1949 pp. 916
13. BRAKO, L. y ZARUCCHI, J. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden, 1993.
14. BRIANA P., HEMMINGA H., MOFFATTA J. and UNWINA C. Canescin, an antibiotic produced by *Penicillium canescens*. *British Mycological Society* Vol 36, Issue 3, September 1953, Pages 243-247. 22 January 2009 [on line] URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B985G-4VF7629-9&_user=10&_coverDate=09%2F30%2F1953&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1494964362&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=37129498e67086e419f8a9b4904cbb8d&searchtype=a (consulted sept. 2010).
15. BRITISH ANTARCTIC SURVEY – Homepage. 2010. índice Fungorum [on line] URL: http://www.antarctica.ac.uk/bas_research/data/access/fungi/flistp1.html (consulted sept. 2010).
16. CANONICA, L; KROSZCZYNSKI, W; RANZI, BM; RINDONE, B; Scolastico, C.. Biosynthesis of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society [Section] D: Chemical Communications* 6, 1971, pp. 257.
17. CHANG S. and HAYES W. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic press. New York, San Francisco London. 1978.
18. CHEN, A. Cultivation of *Lentinula Edodes* on Synthetic Logs. *The Mushroom Growers' Newsletter* 10(4), 2001, pp. 3-9.

19. CHEN, A. What is Shiitake? In The Mushroom Growers Handbook 2: Shiitake Cultivation, Seoul, Korea MushWorld. 2005 pp 1-11.
20. CHERNIN L, ISMAILOV Z, HARAN S, CHET I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 61, 1995, pp. 1720–1726.
21. CHET, I. e INBAR J. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48, 1994, pp. 37-43.
22. CHIMARA, G. Aspectos medico del lentinan aislado del *Lentinus edodes* (Berk). Singer, en Mushroom Bioigy, concise Basics and current developments. Primera edición, ed. por P. G. Miles & S. T, Chang. World Scientific. Singapore. 1993, pp. 114-116.
23. CHRISTENSEN, J. J., KORNER, B. & KJAERGAARD, H. *Aerococcus*- like organisms—an unnoticed urinary tract pathogen. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97, 1989, pp. 539-46.
24. CHRYSTAL J. y FERNÁNDEZ A. *Stenotrophomonas maltophilia*. Rev. chil. infectol. v.23 n.3 Santiago sep. 2006, pp. 247-248. [on line] URL: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v23n3/art09.pdf> (Consulted sept. 2010).
25. CRISAN, E. SANDS. Valor nutricional, en The Biology of Edible Mushrooms. Ed. por Chang y W. A. Mayes, Academic Press. New York & Londres. 1973, pp. 137-165.
26. DE MELLO S. AVILA Z, BRAÚNA L. y PÁDUA R. Selección de aislados de *trichoderma spp.* Para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Brasilia, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnología, 170, 2007 pp. 1340-1676.
27. DINGYI Y., AKMAL S., ALEXANDER E., SUBODH K., AND, HARISH C. Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ. Sci. Technol. Vol 30 N°1, 1996, pp. 136-142.
28. DOMSCH K. GAMS W. & TRAUTE-HEIDE A. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, UK. 1980, 809 p.
29. DUNNE, C. CROWLEY J., Y. MOËNNE-LOCCOZ, D. N. DOWLING, F. J. BRUIJN, AND F. O'GARA. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W18 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology 143, 1997, pp. 3921-3931.

30. DURRELL L. Hyphal invasion by *Trichoderma viride*. Mycopathologia vol 35, N° 2, 1966, pp 138-144.
31. ERTAN F., EKINCI F. & AKTAÇ T. Production of Inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*. Pak. J. Biol. Sci. 6(15): 2003, pp. 1332-1335. [on line] URL: <http://scialert.net/qredirect.php?doi=pjbs.2003.1332.1335&linkid=pdf> (Consulted sept. 2010).
32. EZIASHI E., OMAMOR I. B. and ODIGIE E. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (4), 2007, pp. 388-392. [on line] URL: <http://www.academicjournals.org/AJB> (Consulted oct. 2010).
33. FAN L, PAN, WU Y y KWON H. Manejo de pestes y Enfermedades en el cultivo de Shiitake en bolsa. Shiitake Mushroom Cultivation, Growers Handbook 2: Part I. Shiitake, Cap 5: Manejo de plagas y enfermedades del Shiitake. 2005. [en línea] URL: <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/shiitake/capitulo%205%20pag.202-209.pdf> (Consultado sep 2010).
34. FLETCHER, J. T., P. F. White and R. H. Gaze. Champiñones: control de las enfermedades y plagas. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1986, 159 pp.
35. FLÓREZ, J., ARMIJO A., y MEDIAVILLA A. Farmacología humana. 3ª ed. Masson S.A. Barcelona, 1997.
36. FRISVAD, J.C. and GRAVESEN, S. *Penicillium* and *Aspergillus* from Danish homes and working places with indoor air problems: identification and mycotoxin determination In Health Implications of Fungi in Indoor Environments. R.A. Samson, B. Flannigan, M.E. Flannigan, A.P. Verhoeff, O.C.G. Adan and E.S. Hoekstra (eds). Air Quality Monographs 2. Amsterdam: Elsevier. 1994, pp. 281-290.
37. FURUKAWA K, SIMON JR AND CHAKRABARTY AM Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene, and salicylate catabolism in *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 154 (3): 1983, pp. 1356-62.
38. GARCÍA I. Proyecto experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake) y su desarrollo químico

biológico. Proyecto de tesis para optar título de Licenciada en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 2003.

39. GILL, W. M., and TSUNEDA A. The interaction of soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricicola* with Japanese cultivated mushrooms. Can. J. Microbiol. 43, 1997, pp. 639–648.
40. GÓMEZ DE MEMBRILLERO J. Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*, 1960. [en línea] URL: <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6407/1/N%2017%20%20Clave%20determinativa%20de%20las%20especies%20del%20genero%20Penicillium.pdf> (Consultado Julio 2010).
41. GORSKI R., FRUZYNSKA-JOZWIAK D., ANDRZEJAK K., SOBIERALSKI K., SIWULSKI M. The effect of selected preparations on in vitro growth of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride* found in garden mushroom (*Agaricus bisporus*) crop Phytopatologia Polonica, N°: 42, 2006, pp. 29-35
42. GUÉDEZ, C. CAÑIZÁLEZ, L. CASTILLO, C. OLIVAR, R. Antagonist effect of *Trichoderma harzianum* over some strawberry (*Fragaria spp.*) post harvesting fungi pathogens Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2009 Vol. 29 No. 2009,.1 pp. 34-38. [on line] URL: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_art (Consulted oct. 2010).
43. GUTHRIE JL and CASTLE AJ. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. Can J Microbiol. 2006 Oct, 52(10): 2006, pp. 961-7.
44. HANSEN DS, AUCKEN HM, ABIOLA T, PODSCHUN R: Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. J Clin Microbiol 42: 2004, pp. 3665-9.
45. HATVANI N. KREDICS L, Z. ANTAL Z. and MECS I. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. Journal of Applied Microbiology, 92, 2002, pp.415-423.
46. HARA H, MASAI E, MIYAUCHI K, KATAYAMA Y, FUKUDA M. Characterization of the 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase gene and operon structure of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol., Jan, vol. 185, N ° 1 2003. pp. 41-50.

47. HIROKO HASSEGAWA, R; MEGUMI KASUYA, Maria Catarina y DANTAS VANETTI, Maria Cristina. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electron. J. Biotechnol.* vol.8, n.2 2005. pp. 94-99. [on line] URL: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582005000200011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-3458. (Consulted oct. 2010).
48. ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M. Y VANETTI, M.C.D. Antibacterial Activity Of *Lentinula edodes* Grown In Liquid Medium. *Braz. J. Microbiol.* vol. 32, no. 3, 2001, pp. 206-210.
49. JOINT GENOME INSTITUTE (JGI) US Department of Energy *Trichoderma atroviride*. 2010. [on line] URL: <http://genome.jgi-psf.org/Triat1/Triat1.home.html> (Consulted oct. 2010)
50. JONG and BIRMINGHAM Medicinal and Therapeutic value of the Shiitake mushroom *Adv. Appl. Micro.* 39. 1993, pp.153-184.
51. KAI H, U EFFMERT, G BERG, PIECHULLA B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of plant pathogens *Rhizoctonia solani*. *Microbiol Arco* 187. 2006, pp. 351-360.
52. KANG JG, SHIN SY, KIM MJ, BAJPAI V, MAHESHWARI DK, KANG SC. J. G. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethylchroman-4-one produced by *Burkholderia* sp. MSSP. *Antibiot J* (Tokio). Nov; Vol. 57 N°11 2004, pp.726-31.
53. KAUR J., MUNSHI G.D., SINGH R.S., KOCH E. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* y *Coniothyrium minitans*. *J. Phytopathology* 153, 2005 pp. 274-279.
54. KHANDELWAL, K C. GAUR, A C. Title Degradation of humic acids, extracted from manure and soil by some *streptomyces* and fungi. *Source Zentralbl Bakteriol [Naturwiss]*. 135(2) 1980, pp. 119-122.
55. KIRK ET AL. *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*, Ed. 9. 2001.
56. KLEIN D, EVELEIGH DE. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, eds. *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. London, UK, 1998, pp 57–74.
57. KOBAYASHI, D. Y., GUGLIEMONI, M., AND CLARKE, B. B. Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and

Serratia marcescens as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1995, pp. 1479-1487.

58. LAM K, THU K, TSANG M, MOORE M, GRIES G. Bacteria on housefly eggs, *Mosca doméstica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. *Naturwissenschaften*. Sep;96(9) 2009, pp.1127-32.
59. MACÍAS F. VARELA R., SIMONET A. HORACE G. (+)-Brevione A. The first member of a novel family of bioactive spiroditerpenoids isolated from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. *Tetrahedron Letters*, Volume 41, Issue 15, 8 April 2000, pp. 2683-2686
60. MALLMANN, C. A. HUMMES R. GIACOMINI R. L. Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de Control. Laboratorio de Análisis Micotoxicológicos Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva Universidad Federal de Santa Maria Brasil, 2006.
61. MARTÍNEZ CARRERA D. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micol Apl Int* 2002; 14: 61-74. *MICOL. APL. INT.*, 14(2). 2002, pp. 61-74.
62. MEDIAVILLA, A., ANGULO, J., RODERO, J.M., DOMÍNGUEZ, E., GALÁN, C., GARCÍA, F.I. Fungal contamination of potential medical interest in Spanish grain stores. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 6, 1996, pp. 196-201.
63. MONTOYA B S. HERNÁNDEZ H. F. Importancia de la cadena productiva del hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) para fomentar su cultivo. *Vector*, Volumen 1, No. 1 Enero - Diciembre 2006, pp. 63 – 68.
64. NAHM KH, CARLSON CW (1985). Effects of cellulase from *Trichoderma viride* on nutrient utilization by broilers. *Poult Sci.*, 64(8): 1536-1540.
65. NICODERMA. 2010. http://www.neemnico.com/spanish/Nicoderma_Spanish.pdf (Consulted sep. 2010).
66. OEI P. Mushrooms Cultivation. Tercera Edición. Backhuys Publishers. Leiden Holanda. 2003.
67. OET. Especies nativas y exóticas para la reforestación en la zona sur de Costa Rica. Memoria del II Encuentro sobre Especies Forestales (eds. D. Nichols & E Gonzalez). OET, Costa Rica. 1991, pp. 21-327.

68. OGAWA K, YOSHIDA N, KARIYA K, OHNISHI C, IKEDA R. Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinula edodes*, Shiitake mushroom. J Gen Appl Microbiol. 2002 Feb Vol 48 N°1 2002, pp. 25-33.
69. PAULSEN, I.T., PRESS, C.M., RAVEL, J. "Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5." Nature Biotechnology. vol 23. 2005, pp. 873-878.
70. PACUMBABA, R. P., BEYL, C. A., AND PACUMBABA, R. O., Jr. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. Plant Dis. 83 1999, pp.20-23.
71. PEDREROS J. Evaluación Del Crecimiento y La Producción de *Lentinula edodes* (Shiitake) en Residuos Agroindustriales. Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad De Ciencias, Carrera De Microbiología Industrial. 2007.
72. PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves In. Andrews, J.H. & Hirano, S.S. (Eds.) Microbial ecology of leaves. Springer-Verlag, 1991. pp.179-197.
73. PICKERING LK. Red book (Report of the committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics): *Burkholderia cepacia*. 25th ed. Elk Grove Village, IL: APP; 2003, pp. 224-5.
74. PIONTELLI E. GIUSIANO Gustavo, VIVAR Valía. Distribución Altitudinal de Hongos Queratinofilos, Epifitos Y Endofitos En Suelos Desérticos Del Norte Chileno (II Región, 23°L.S Y 68°L.W). Boletín Micológico vol. 17, 2002 pp.33 – 49.
75. PITT, J. I. and HOCKING A D. 2009. Fungi and food spoilage, 3 ed springer science+business Media. New York. [on line] URL: <http://books.google.com.co/books?id=B1s6GhOlzkC&pg=PA214&lpg=PA213&dq=Penicillium> (Consulted july. 2010).
76. PIYUSH PANDEY, S. KANG C. AND MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia sp.* MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. CURRENT SCIENCE, vol. 89, N° 1, 10 July 2005.

77. PODSCHUN, R. Y U. ULLMANN. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 1998, 589-603.
78. PUKAHUTA C., LIMTONG S., SUWANARIT P. and NUTALAYA S. Species Diversity of *Trichoderma* Contaminating Shiitake Production. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34, 2000, pp. 478 – 485.
79. RANKING, L., and PAULITZ, T. C.. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. *Plant Dis.* 78, 1994, pp. 447-451.
80. RAPER, K.B. and THOM, C. A Manual of the Penicillia. International Books and Periodicals Supply Service. New Delhi, India. 1984.
81. RENDÓN M. DE VILLEROS P. “Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del Shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido” Universidad Eafit Escuela de Ingenierías Departamento de Ingeniería de Procesos Medellín 2004.
82. Rev Iberoam Micol. 2002 (a). *Penicillium brevicompactum* Dierckx. PDF/Adobe Acrobat. [on line] URL: <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/035.PDF>. (Consulted july. 2010).
83. Rev Iberoam Micol. 2002 (b) *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin. PDF/Adobe Acrobat. [on line] URL: <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF> (Consulted july. 2010).
84. RYAN MP, ADLEY CC. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent gram-negative nosocomial infectious organism. *J Hosp Infect.* Jul; vol 75 N° 3: 2010, pp. 153-7.
85. RIFAI, M.R.. A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycological Papers, No.16 Commonwealth Mycological Institute. Kew. 1969, 56 p.
86. RIVERA V. L. Identificación y caracterización de hongos y bacterias asociados con la pudrición del cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado Académico de Licenciatura. Zamorano. Honduras Diciembre. 2007.
87. ROCHA- RAMÍREZ, V., OMERO, C., CHET, I., HORWITZ, BA & HERRERA E. A. *Trichoderma atroviride* G-protein subunit gene tga1

is involved in mycoparasitic, coiling and conidiation. Eukaryot Cell Vol. 1, No. 4, 2002, pp. 594-605.

88. ROMERO O., HUERTA M., DAMIÁN M., DOMÍNGUEZ F y ARELLANO D. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI N° 2 Diciembre 2009. 143- 151. [en línea] URL: www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/.../12297 consultado septiembre de 2010. (Consultado oct. 2010).
89. ROYSE, D. J. and BAHLER, C. C. Effects of genotype, spawn run time, and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. Appl. Environ. Microbiol, 52, 1986, pp.1425-1427.
90. SAMUELS G. J. and DODD S. L. The Mycological Society of America *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94(1), 2002, pp. 146-170.
91. SAMUELS, GJ, CHAVERRI , P., FARR, DF, Y MCCRAY, EB. *Trichoderma*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. 2010.. [on line] URL: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (Consulted oct. 2010).
92. SAVOIE, J. and MATA G. and BILLETTE C.. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and Shiitake, *Lentinula edodes* Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 49, N° 5, 1998, pp. 589-593.
93. SAVOIE J. and MATA G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15, 1999, pp. 369-373.
94. SAVOIE J. MATA G. and MAMOUN M. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot basidiomycetes and *Trichoderma harzianum* biotype Th2. Mycologia 93: 2001, pp. 243–248.
95. SAVOIE J. and MATA G.. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. Mycologia, 95(2), 2003, pp. 191–199.
96. SCHAAD N, JONES J, CHUN W, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3 ed. 2001, 373 p.

97. SCHISLER, D. A., AND SLININGER, P. J. Selection and performance of bacterial strains for biologically controlling *Fusarium* dry rot of potatoes incited by *Gibberella pulicaris*. *Plant Dis.* 78: 1994, pp. 251-255.
98. SEABY, D. A. *Trichoderma* as a weed mold or pathogen in mushroom cultivation. 1998, pp. 267-287. In: G. E. Harman y C. P. Kubicek. *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Eds, Taylor & Francis, Londres 1998.
99. SMITH G. Introducción a la micología industrial. 5a ed. Zaragoza, España: Acribia. 1963, pp. 443.
100. SOBAL, M., MORALES P., BONILLA M., HUERTA G. & MARTÍNEZ-CARRERA D. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 2007. pp 14. In: SÁNCHEZ D., MATA G. y LEAL H. El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. J. E.. ECOSUR-CONACYT, México, D.F 2007.
101. STAMETS, P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Toronto: TEN SPEED PRESS, 2000, pp. 259 – 276. En: RENDÓN Manuel DE VILLEROS Pablo Andres. “Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del shiitake (*Lentinula edodes*) en cultivo sumergido” Universidad Eafit Escuela De Ingenierías Departamento De Ingeniería De Procesos Medellín. 2004.
102. STOYANOVA, M., PAVLINA, I., MONCHEVA, P., Y BOGATZEVSKA, N.. Biodiversity and Incidence of *Burkholderia Species*. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq* vol 21 N° 3, 2007, pp. 306-310.
103. TERASHIMA Y. IGUSA H. and OHGA S. Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates. *Mycoscience* vol 43, N° 3, 2002, pp. 277- 280.
104. TOKIMOTO K, KOMATSU M. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. *Ann Phytopath Soc Japan* 45, 1979, pp.261–264.
105. TORRENEGRA R. GARCIA L. Obtención de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa colombiana, de *Penicillium sp* sg 91. y evaluación de su actividad antimicrobiana. Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. Memorias del XVIII Congreso Italo-

latinoamericano de etnomedicina “Juan Tomás Roig Mesa” 14 al 18 de septiembre de 2009, Ciudad de La Habana, Cuba.

106. UDAKA S. Screening for Protein-producing Bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 40, 1976, pp. 523-528
107. Universidad de Extremadura. Basidiomicetos 2002 <http://www.unex.es/botánica/LHB/bacidiomicetos/basidio.2htm>. en RENDÓN Manuel DE VILLEROS Pablo Andrés. “Evaluación del crecimiento y producción de exopolisacáridos del Shiitake (*Lentinula Edodes*) en cultivo sumergido” Universidad Eafit Escuela de Ingenierías Departamento de Ingeniería de procesos Medellín 2004.
108. VETCHINKINA, E. NIKITINA, V. TSIVILEVA, O. GARIBOVA, L. Activity of *Lentinus edodes* intracellular lectins at various developmental stages of the fungus. *Applied Biochemistry & Microbiology*; Jan2008, Vol. 44 Issue 1, 2008. pp. 66-72, 7p, 3 1.
109. YEUNG KS, GUBUI J. Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). *Journal of the Society for Integrative Oncology*; Summer, Vol. 6 Issue 3, 2008, pp. 134-134, 1p.
110. VELÁZQUEZ-, M. BAUTISTA, S. HERNÁNDEZ, A. GUERRA, M. y AMORA, E. Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* vol. 26 2008.. [en línea] URL: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61226108>. ISSN 0185-3309. (Consultado oct. 2010).
111. WEIL A. Shiitake, Enoki: A Mushroom a Day, *American Health*, May, 1987, pp.129-134.
112. WILLIAMS, R. E. O., A. HIRCH, and COWAN S. T. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J. Gen. Microbiol.* 8, 1953, pp. 475–480.
113. ZHANG Z. and YUEN G. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. *PHYTOPATHOLOGY*. Vol. 89, No. 9, 1999, pp. 817-822.
114. http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/Mycota/thumbnails/Cladosporium%2520cladosporioides-5-d-8_psd.jpg&imgrefurl. *Cladosporium cladosporioides*. (Consultado, septiembre 2010).