

AVANCES EN LA TECNOLOGÍA DE LA PRODUCCIÓN COMERCIAL DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGOS CULTIVADOS 4



ACTAS DE LAS V JORNADAS TÉCNICAS DEL CHAMPIÑÓN
Y OTROS HONGOS CULTIVADOS
EN CASTILLA LA MANCHA

**AVANCES EN LA TECNOLOGÍA DE LA
PRODUCCIÓN COMERCIAL DEL CHAMPIÑÓN
Y OTROS HONGOS CULTIVADOS 4**

ACTAS DE LAS V JORNADAS TÉCNICAS DEL CHAMPIÑÓN
Y OTROS HONGOS CULTIVADOS EN CASTILLA LA MANCHA

Celebradas en Villanueva de la Jara (Cuenca)

10 y 11 de Noviembre de 2009

Primera edición: Julio, 2012

Diseño Portada: Antonio Martínez Carrasco

Edita: Patronato de Desarrollo Provincial
Diputación Provincial de Cuenca

Imprime: MG Color Soluciones Gráficas, S.L.L.
Avda. El Progreso, 37
16400 Tarancón (Cuenca)

D.L.: CU-130-2012

I.S.B.N.: 978-84-615-9584-6

PRESENTACIÓN

En este volumen se recogen las ponencias presentadas en las V Jornadas Técnicas del Champiñón y Otros Hongos Cultivados en Castilla-La Mancha, celebradas en Villanueva de La Jara (Cuenca), durante los días 10 y 11 de noviembre de 2009.

Al igual que en ediciones anteriores, participaron investigadores que desarrollan su labor profesional en el ámbito del cultivo de los hongos comestibles. En esta ocasión, se destacó el papel que puede desempeñar el champiñón como alimento funcional, ya que cuenta con numerosos componentes que ayudan a prevenir o incluso a paliar los efectos de algunas de las enfermedades más frecuentes en la sociedad actual. Se subrayó la importancia que tiene para nuestro sector productivo continuar ofreciendo a los consumidores un producto de calidad, en estado óptimo y bien conservado. Con el fin de ayudar a conseguir este objetivo, se abordó la necesidad de implantar un sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC), en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados. También se realizaron propuestas sobre el cultivo de algunas especies fúngicas que resultan novedosas en nuestra comarca y que son interesantes tanto por su valor comercial y culinario como por su aplicación farmacéutica, nos referimos en concreto a los hongos *Lentinula edodes* (Shiitake), *Tuber melanosporum* (Trufa) y *Agaricus blazei*. El control de plagas y enfermedades del champiñón, bien mediante el uso de productos fitosanitarios, o bien mediante métodos de control biológico, también fue objeto de varias ponencias. Las recomendaciones de control ofrecidas por los conferenciantes están en consonancia con el respeto al medio ambiente y con la seguridad alimentaria que reclaman los consumidores. Por último, al igual que sucedió en anteriores ediciones, se realizaron varias ponencias sobre la valorización del sustrato post-cultivo de hongos, incidiendo sobre todo en la elaboración de productos orgánicos para enmiendas de suelos, en su utilización como enmienda en suelos contaminados por metales pesados, y en su aplicación como material para elaborar mezclas de coberturas y sustratos para el cultivo de setas del género *Pleurotus*.

Con la publicación de este volumen, la Diputación de Cuenca, a través del Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, desea reiterar su apoyo al sector productor de hongos cultivados de nuestra provincia. Esperamos que la información que aquí se presenta pueda ayudar a resolver algunos aspectos problemáticos del cultivo de hongos comestibles y contribuir a elevar el grado de rentabilidad de este importante sector productivo de Castilla-La Mancha.

Benjamín Prieto Valencia
Presidente de la Diputación Provincial de Cuenca

ÍNDICE

El champiñón como alimento funcional	7
Soler-Rivas, C. y Reglero, G.	
Champiñón como una alternativa al aporte de selenio en la dieta.....	21
Pérez Clavijo, M., Urbina Sáenz, C. y Clavijo Sáenz, C.	
Champiñón laminado. Refrigeración, lavado y envasado.	33
Simón, A.	
Guía de implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados	45
Peñaranda Núñez, J.A., Pardo González, J.E. y A. Pardo Giménez	
Características generales, producción y comercialización de <i>Agaricus blazei</i> (Murril) ss. Heinemann (<i>A. brasiliensis</i>): Una nueva alternativa de cultivo de hongo en España	55
Zied, D.C., Pardo González, J.E., Pardo Giménez, A. y M. Teixeira Almeida Minhoni	
Cultivo de Shiitake, <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler, en sustrato formulado	77
Zied, D.C., Pardo González, J.E., Pardo Giménez, A. y M. Teixeira Almeida Minhoni	
Valorización en agricultura de la materia orgánica procedente del cultivo de champiñón y setas	89
Masaguer, A., Checa, J.G. y M.J. Moya	
Reutilización de sustratos post-cultivo de hongos comestibles en nuevos ciclos de producción	99
Pardo-Giménez, A., Picornell Buendía, M.R., de Juan Valero, A. y J.E. Pardo-González	
Utilización de los SPCH (sustratos postcultivo de champiñón) como tierra de cobertura para el cultivo de <i>Agaricus bisporus</i>	111
Pérez-Clavijo, M., Ezquerro-Ezquerro, L. y S. Grijalba-Garrido	
Aplicación de nematodos entomopatógenos como método de control de dípteros en el cultivo de champiñón	119
Navarro, M.J. y F.J. Gea	

Efecto de varios fungicidas sobre la mole húmeda (<i>Mycogone perniciosa</i>) y sobre la producción de champiñón.....	131
Gea, F.J., Lainez, M.C. y M.J. Navarro	
Eficacia del té de compost elaborado con sustratos post-cultivo de hongos comestibles sobre la mole seca (<i>Verticillium fungicola</i>).....	143
Gea, F.J., Lainez, M.C., Navarro, M.J., Santos, M. y J.C. Tello	
El cultivo de la trufa. Una alternativa agrícola-forestal para Castilla-La Mancha.	155
M. Honrubia	

El champiñón como alimento funcional

Cristina Soler-Rivas y Guillermo Reglero

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación. Universidad Autónoma de Madrid.

Un alimento funcional es aquel que proporciona beneficios para la salud mas allá de los requerimientos nutricionales básicos (su utilización como fuente de energía), es decir, es un alimento que contiene ingredientes que se han probado que ayudan a mejorar la salud humana porque son capaces de reducir el riesgo de contraer enfermedades y promocionar una mejor salud. Los alimentos funcionales pueden ser alimentos tal cual o fortificados con ingredientes que ejercen un beneficio a la salud física y mental del individuo que lo consume (Hicks y Moreau, 2001).

El mercado de los alimentos funcionales

Actualmente en los mercados existen numerosos alimentos que se venden como funcionales alegando múltiples propiedades más o menos definidas según el producto. Se podrían clasificar dentro de las siguientes categorías: alimentos "moda", ingredientes "moda", alimentos con una finalidad específica, alimentos para un sector específico de la población o alimentos sin ninguna finalidad específica.

Como alimentos "moda" se incluiría a todos aquellos enriquecidos, obtenidos o relacionados con un alimento que se ha puesto de moda por sus propiedades beneficiosas para la salud. Un ejemplo de este tipo de alimentos podrían ser las leches y/o derivados lácteos, los zumos, las galletas, las barritas energéticas etc. que contienen en su composición soja, extractos de soja, leche de soja, proteínas de soja, isoflavonas de soja etc. Otros "alimentos moda" serían los enriquecidos en *Aloe vera*, en melisa, en jalea real etc.

Bajo la categoría de alimentos con "ingredientes moda" se encontrarían aquellos alimentos que incluyen ingredientes que por sus características beneficiosas se consideran beneficiosos para la salud como por ejemplo, los derivados lácteos, ovoproductos etc. enriquecidos en "ácidos grasos ω -3" que al parecer previenen de enfermedades cardiovasculares. También son frecuentes los productos enriquecidos con "fibra dietética" también llamados alimentos prebióticos o con fibra bioactiva (productos de panadería, cereales etc.). Otros ingredientes de moda son el "ácido oleico" que se utiliza para mejorar el perfil de ácidos grasos de cierto tipo de aceites vegetales u otro tipo de grasas con efecto hipocalórico (aceites, frutos secos etc. con oleosan, tonalin etc.).

También se venden alimentos que alegan una finalidad específica muy concreta como los productos que dicen que son capaces de "ayudar a las defensas" o con "efecto bífidus" conocidos como alimentos probióticos. Otros aseguran ayudar a reducir el nivel de

colesterol, la hipertensión, mantener el índice glucémico, reducir los niveles de ansiedad etc.

Otros están diseñados para un sector específico de la población como los que llevan por ejemplo L-carnitina, un compuesto que aumenta el rendimiento de los deportistas, o los que llevan isoflavonas para evitar los efectos de la menopausia entre mujeres maduras o con ácido fólico recomendadas para embarazadas, o mezclas específicas de ingredientes para mejorar la alimentación de niños o mayores (calcio, minerales, vitaminas etc.)

El resto de alimentos funcionales se podrían incluir en un grupo de productos sin una finalidad concreta, simplemente que son mejores que la versión ofrecida hasta ahora como "normal" ya que se han reducido los niveles de sal o de fosfatos, o se han sustituido los colorantes artificiales por naturales. Los hay que llevan verdura o fruta alegando que su consumo frecuente es recomendado, otros indican que contienen nutrientes para "mantenerse bien" o "bella" sin definir específicamente cómo se consigue este efecto, etc.

Según las últimas estadísticas obtenidas de encuestas, destinadas a recoger la opinión del consumidor medio sobre la avalancha de nuevos productos funcionales que se lanzan al mercado casi a diario, se deduce que la mayoría de los consumidores se encuentran un poco confusos y se preguntan sobre todo si será verdad todo lo que dice la publicidad sobre ellos. Algunos tienen la sensación de que si no los toman van a padecer enfermedades y otros que como los toman ya pueden despreocuparse de seguir una dieta variada y saludable. Pero, como casi todo en esta vida, la verdad sobre los alimentos funcionales es una verdad a medias y en este caso, que el producto se acerque más a la verdad o a la mentira viene definido principalmente por la concentración a la que se encuentran los ingredientes bioactivos dentro del producto. Por ejemplo: entre los diferentes tipos de leche que están enriquecidas en ω -3 hay de dos tipos, unas están enriquecidas en ácido linolénico obtenido de aceites vegetales. Es cierto que este ácido graso es un ω -3 y es precursor de los que realmente son bioactivos que son el DHA y el EPA (ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico), luego si ingerimos ácido linolénico se transformará en estos ácidos importantes dentro de nuestro organismo, pero esta transformación en adultos es muy pobre, luego el efecto es mínimo si tenemos en cuenta que además el ácido linolénico está añadido en un 0,05% a la leche, una concentración bastante baja. Otros tipos de leche están enriquecidas directamente con EPA y DHA de aceites de pescado por lo que en principio serían más efectivas pero por cuestiones tecnológicas solo se pueden añadir en concentraciones iguales o inferiores al 0,03%. Si comparamos estas cantidades con el contenido en ω -3 que tienen por ejemplo las sardinas (casi 3 g de ω -3/100g de sardina) llegamos a la conclusión de que habría que tomarse unos 8 litros de este tipo de leche para conseguir el mismo efecto que se conseguiría tomando una sardina.

Los productos que contienen fitoesteroles o derivados de estos compuestos y que alegan poder reducir el nivel de colesterol son de eficacia variable también dependiendo de su concentración en el producto que se vende. Solo son realmente efectivos aquellos que llegan a cantidades suficientes como los que incluyen 1,6 g fitoesteroles o 2 g estanoles por

botellita pero hay que tener en cuenta que existe un máximo en su ingesta de 3 g diarios y que por encima de esa cantidad pueden llegar a ser tóxicos, cosa que ocurriría por ejemplo si se toman junto con un abundante plato de verduras. Otra cosa que se debe tener en cuenta y que está advertido en estos productos pero en letras muy pequeñas es que su consumo puede inhibir la asimilación de otros compuestos beneficiosos para la salud como los carotenoides (precursores de la vitamina A) (Delaquis y Mazza, 1997; Ferrari y Torres, 2003).

Alimentos funcionales a base de hongos comestibles

Actualmente en los supermercados españoles, de todos estos alimentos funcionales ofertados no existe ninguno que contenga champiñón o alguna otra especie de hongo comestible como ingrediente bioactivo. Sin embargo, en otros países del mundo sí que se encuentran fácilmente, sobre todo en Japón que son comunes desde hace bastantes años y se han ido extendiendo sobre todo al resto de países asiáticos.

En Japón se dieron dos factores que resultaron muy favorables para que se encuentren numerosos alimentos funcionales a base de hongos. Por un lado hacia los años 60, los gobiernos japoneses fueron los primeros en fomentar el mercado de alimentos funcionales y de regularlo. Todo producto que quisiera ser vendido como alimento funcional debía pasar una serie de pasos, que incluía una investigación científica que avalase lo que se alegaba para conseguir que su producto pudiera poner una etiqueta oficial que lo nominaba como producto FOSHU (*Food for Specific Health Use*). Por otro lado, en este país existía la tradición casi milenaria de consumir hongos comestibles como remedio para enfermedades.

De los alimentos con etiqueta FOSHU que se venden hoy en día en Japón, la mayoría son alimentos prebióticos o con fibra dietética, también hay muchos probióticos. En menor cantidad también los hay para regular el nivel de colesterol, la hipertensión y el metabolismo de lípidos. En todas estas categorías los hay que incluyen hongos como ingredientes bioactivos. Los alimentos ofertados son de dos tipos, o bien se venden directamente como hongo fresco o deshidratado al que se le atribuyen propiedades que por tradición los japoneses conocen, o bien se venden como hongos procesados y transformados en extractos alcohólicos, acuosos, concentrados etc. a las empresas de alimentos como aditivos alimentarios para que sean ellas las que se los añadan a cierto tipo de alimentos comunes para "funcionalizarlos", es decir, venderlos posteriormente como alimentos funcionales. Estos aditivos alimentarios "con un plus", son en realidad potenciadores del sabor para productos alimenticios que en España también se venden a las industrias alimentarias pero se obtienen por fermentaciones con levaduras. En Japón aprovechan que los hongos también son ricos en glutamato, nucleótidos etc. y se venden mejor alegando que aparte de simular el aroma de la carne, estos otros aditivos actúan como antioxidantes naturales evitando la oxidación del producto e incluso ejercen un efecto beneficioso para la salud (el "plus" saludable) como fuente extra de fibra dietética o

extra de vitaminas y minerales. Así, en una búsqueda de patentes reciente se encontraron 10 de ellas describiendo preparados o suplementos alimenticios a base de hongos para potenciar las propiedades organolépticas y saludables de los productos alimenticios (Tabla 1).

También es frecuente encontrar en los supermercados japoneses barras energéticas, diferentes tipos de pan y productos de panadería, espaguetis chinos (noodles), extrusionados (aperitivo tipo "gusanitos") o galletas que contienen multitud de especies diferentes de hongos principalmente como fuente extra de fibra dietética y antioxidantes. En realidad lo que hacen los panaderos es sustituir parcialmente la harina de trigo por hongos pulverizados y normalmente utilizan para la molienda los hongos de peor calidad o las partes desechables. Existen 8 productos patentados y muchos otros (tipo pan de uso diario) ofertados en los supermercados y establecimientos similares.

También se venden todo tipo de bebidas a base de hongos bioactivos. Se pueden encontrar fácilmente cervezas, vinos, licores, tes y cafés que incorporan extractos de hongos solos o mezclados con otras plantas también consideradas como bioactivas. Las especies de hongos más utilizados son el *Agaricus blazeii* y varias especies de los género Ganoderma y Lentinula, aunque hay muchos otros. La publicidad sobre estas bebidas alega propiedades muy diversas unos son antioxidantes, otros inmunomodulatorias o antitumorales, antivirales, anti-hipertensión, reguladores de nivel de colesterol, de glucosa, etc.

Aparte de los indicados, también se ofertan preparados de hongos como salsas específicas para condimentar cierto tipo de platos o como sustitutos de carnes y pescados para vegetarianos (tipo tofu, hamburguesas vegetales etc.), dentro de mermeladas (o chutney) o como productos fermentados e incluso, al igual que ocurre en Europa con otros productos funcionales, también se comercializan preparados específicos para ciertos sectores de población con requerimientos nutricionales diferentes. Así se recomienda para los niños los chocolates y noodles enriquecidos en *L. edodes* para evitar la anemia y estimular el apetito. Para adultos activos se sugiere la leche de soja con Ganoderma y otros productos similares para ancianos que les ayuda a reducir el riesgo de enfermedades como la hiperlipidemia, osteoporosis, diabetes etc. (Chang, 1996).

Aún queda por confirmar la veracidad de algunos de estos productos, pero en la mayoría de los casos, sobre todo en aquellos productos que consiguieron la denominación de FOSHU, existen realmente pruebas científicas que confirman su efectividad. Hay que recordar que Japón comenzó hace mucho tiempo a trabajar en el diseño de alimentos funcionales, lo que les supone una ventaja temporal para la ejecución y desarrollo de un mayor número de estudios científicos que las que se han podido realizar en Estados Unidos o Europa. Allí incluso se han realizado pruebas a nivel clínico sobre determinados ingredientes bioactivos.

Los estudios clínicos que más avanzados están son aquellos que demuestran la capacidad antitumoral de extractos de ciertos hongos ya que hace mucho tiempo estudios

epidemiológicos relacionaron el consumo habitual de Flammulinas con una reducción del riesgo a padecer cierto tipo de cánceres. También hace mucho que se aislaron polisacáridos específicos como el kerstino (en 1970), el lentinano (1985), esquizofilano (1986) etc., que estaban autorizados y se utilizaban en los hospitales japoneses como adyuvantes en tratamientos de cáncer. Actualmente se conocen y se utilizan muchos más y ya no solo son polisacáridos de tipo β -glucanos como los mencionados sino glicoproteínas como las lectinas. Los Japoneses también han avanzado mucho en el estudio de las actividades de los hongos como alimentos prebióticos, sobre todo con *Agaricus blazeii* aunque no es la única especie investigada (Leung, Fung *et al.*, 1997; Minato, Mizuno *et al.*, 1999).

En los últimos cinco años también han comenzado a aparecer alimentos funcionales a base de hongos comestibles en Estados Unidos y en Canadá. Actualmente, el mercado de los alimentos funcionales en estos países está bastante bien regulado y para poder vender un producto con una alegación de propiedades saludables debe conseguir la autorización de la FDA (Food and Drug Administration). Según lo que se quiera alegar deberá cumplir unos requisitos u otros clasificados bajo 4 categorías que requieren de mayor a menor grado de estudios científicos que demuestren su efectividad. Normalmente, se permite el tránsito fluido de alimentos funcionales entre Japón y EEUU, sobre todo de aquellos productos que consiguieron su denominación FOSHU y tienen un elevado mercado allí debido principalmente a la alta tasa de inmigración asiática en ese país. Además, los norteamericanos se han dado cuenta de sus posibilidades y comienzan a aparecer patentes sobre el uso de hongos funcionales para todo tipo de producto "beneficioso para la salud", sobre todo aprovechando los sub-productos de cultivos de hongos para el diseño de nuevos alimentos (Tabla 1).

En Europa se tardó mucho tiempo en regular los alimentos funcionales así que hasta ahora se podía vender cualquier producto alegando realmente nada concreto pero que daba a entender que mejoraba la salud del consumidor. En Enero del 2007 la acción concertada FUFOSE (*Functional Food Science in Europe*) y la UE publicaron finalmente la ley que regula todos estos productos y sus alegaciones de salud y desde Julio del 2007, fecha de aplicación de la ley, hasta ahora en España, de 4000 productos que han solicitado su incorporación al mercado como alimento funcional solo 7 han conseguido la aprobación. Ninguno de los 7 aprobados hasta ahora y probablemente ninguno de los 4000 presentados incluye algún tipo de hongo como ingrediente bioactivo para funcionalizar alimentos. En Europa los hongos bioactivos se siguen vendiendo solo como suplementos nutricionales en herbolarios o por internet. Luego su comercialización como alimentos funcionales o ingredientes para funcionalizar alimentos supone un nuevo mercado que económicamente no es rechazable.

Propiedades bioactivas del champiñón y otros hongos comestibles

Los hongos deben ser considerados como alimentos saludables por muchos de los mismos motivos por los que otros alimentos ya se consideran, por ejemplo, al igual que las

verduras y frutas, los hongos poseen compuestos antioxidantes como las vitaminas C, E, D, también tienen compuestos fenólicos y los que son de color naranja, como el níscolo o la cantarela, presentan carotenoides que son precursores de la vitamina A (Barros, Ferreira *et al.*, 2007; Barros, Cruz *et al.*, 2008). Además contienen ergotioneina (Figura 1), un antioxidante muy potente que actúa a varios niveles en nuestro organismo contra muchas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y que es capaz de inhibir enfermedades autoinmunes de tipo reumáticas, artritis etc. Algunas especies de hongos como el *Boletus edulis* contienen casi 50 veces más ergotioneina que el hígado, considerado hasta ahora como la mejor fuente de este compuesto, seguido por las legumbres, el ajo, etc. El champiñón, dependiendo de la variedad y las condiciones de cultivo puede también llegar a tener entre 5-8 veces más ergotioneina que el hígado (Dubost, Beelman *et al.*, 2006; Franzoni, Colognato *et al.*, 2006; Dubost, Ou *et al.*, 2007; Ey, Schömig *et al.*, 2007).

Además, cuando se compararon los efectos antioxidantes de la ergotioneina pura y un extracto de *Flammulina velutipes* con la misma concentración del compuesto, se descubrió que el extracto mostraba mayor capacidad antioxidante que el compuesto puro indicando que los hongos tienen algo más, que podrían ser fenoles, que hace que su poder antioxidante se incremente (que se produzcan sinergias).

Cuando se comparan las propiedades antioxidantes de los hongos con las verduras consideradas como una buena fuente de estos compuestos, se puede observar que los hongos tienen propiedades intermedias. Según los resultados obtenidos por el método ORAC, algunas verduras como el brócoli y el pimiento rojo tienen mayor capacidad antioxidante que hongos como los portabella y los crimini, pero otras como la judía verde y la zanahoria tienen menor capacidad. Aunque hay que tener en cuenta que los resultados de este tipo de comparaciones pueden variar dependiendo del método de medida que se utilice, porque hay muchos y todos válidos, pero dependen del mecanismo de actuación del compuesto o compuestos predominantes como antioxidantes. Por ejemplo, si medimos la capacidad antioxidante del champiñón utilizando el método del DPPH o su actuación como inhibidor de peróxidos (Figura 2), el champiñón muestra una capacidad muy superior a otros hongos comúnmente consumidos en España como el pleurotus, el shiitake y otros hongos silvestres como el boletus, la cantarela, la amanita, el níscolo, la colmenilla etc. Sin embargo, si utilizamos el método del ABTS, su capacidad es inferior a muchos de los mencionados. Esto indica que el champiñón tiene cierto tipo de antioxidantes y que son diferentes de los de las otras especies (Tsai, Tsai *et al.*, 2007; Ramirez-Anguiano *et al.*, 2007; Barros, Falcão *et al.*, 2008).

Además de compuestos antioxidantes, los hongos contienen compuestos antimicrobianos conocidos y explotados por la industria farmacéutica desde hace mucho. Hoy en día existen multitud de especies de hongos (comestibles y no comestibles) cuyos micelios son utilizados habitualmente para la obtención de antibióticos. Los hongos comestibles aunque sean macroscópicos también son capaces de producir algunos de estos compuestos y suelen ser muy diferentes de los de las plantas y microorganismos de origen bacteriano porque se generan por rutas metabólicas totalmente distintas. Los que mejor se

conocen son los del *Lentinus edodes* (lentionina, lentina, lentinamicina etc.), *L. crinitus* (desoxihipnofilina), *Ganoderma lucidum* (ganomicinas etc), *P. ostreatus* (octanona, benzaldehídos, pleurostrin etc.) y se están descubriendo más en otras especies como algunos péptidos en *P. eryngii* y *B. edulis* o sesquiterpenoides en *F. velutipes* etc. (Hirasawa *et al.*, 1999; Harrowven *et al.*, 2001; Kitzberger *et al.*, 2007). Los estudios realizados sobre el champiñón eran escasos e indicaban que carecía de este tipo de compuestos hasta que Santoyo *et al.* (2009) descubrieron que no se detectaban en el champiñón y en otro tipo de hongos comestibles porque los ensayos se estaban realizando sin tener en cuenta la presencia de enzimas oxidativas. Si los ensayos experimentales realizados para detectar las actividades antimicrobianas de extractos acuosos de hongos comestibles se realizaban en presencia de inhibidores de enzimas como la tirosinasa, la lacasa y las peroxidasa, algunos hongos sí que mostraban actividades antimicrobianas interesantes. Así, los extractos acuosos obtenidos de cantarellas eran efectivos contra el *Staphylococcus aureus*, un patógeno gram positivo común de los alimentos, y los extractos de los niscalos inhibían el crecimiento de bacterias gram negativas como *Escherichia coli*. *Agaricus bisporus* también presentaba compuestos que inhibían el crecimiento de las dos bacterias mencionadas aunque no era eficaz contra otros patógenos de origen fúngico como *Candida albicans* (en forma de levadura) y *Aspergillus niger*. Si se comparaba la actividad anti-*E. coli* observada en los extractos acuosos de champiñón con otros productos alimenticios como extractos de romero y laurel considerados como plantas con buenas propiedades antimicrobianas, el champiñón era menos efectivo que el romero pero un poco más que el laurel, e incluso muy similar a algunos extractos de ganoderma, hongo famoso por sus múltiples propiedades antimicrobianas.

Las propiedades antivirales de los hongos comestibles se intuían desde hace tiempo ya que los japoneses usaban el shiitake como remedio casero contra la gripe. Estudios posteriores con mayor base científica demostraron su eficacia y también la de otros hongos como ganoderma no solo contra el virus de la influenza tipo A, sino contra el Herpes simplex tipo 1 y el de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Los responsables de esta actividad eran triterpenos y otros compuestos identificados como ganodermadiol y lidadiol. *F. velutipes* produce también una glicoproteína llamada velutina capaz de inhibir al HIV-1 y otras especies de hongos, incluso del género *Agaricus*, como *A. blazeii* producen polisacáridos sulfatados efectivos contra la polio y el herpes (tipo 1 y 2). Sin embargo, las propiedades antivirales del champiñón no se habían investigado hasta hace poco (Eo *et al.*, 2000).

El mecanismo por el cual un fármaco o un extracto cualquiera actúan como antiviral depende del tipo de compuesto de que se trate. Simplificando estos mecanismos se podría decir que los antivirales pueden actuar en cuatro de las etapas que tienen lugar durante el proceso de infección de un virus. Para determinar este mecanismo se tendría que ver si actúa en cualquiera de las cuatro etapas. La primera etapa sería identificar si el compuesto es capaz de "matar" al virus antes de que infecte, es lo que se llama efecto viricida. Otra etapa donde podría actuar sería impidiendo que el virus alcance las células, o evitando que las células absorban al virus y por último, impidiendo que aquel virus que

haya infectado la célula se pueda reproducir. Los extractos acuosos de champiñón no son capaces de matar al virus del Herpes pero si dificultan que éste llegue a las células, que se absorba y que se replique y en algunos pasos es más eficiente que otros hongos como *B. edulis*, *P. ostreatus* y *L. edodes*. Además, los extractos de champiñón estudiados previenen la infección, que es un estadio mucho mejor que la mayoría de los antivirales que se venden hoy en día (fármacos) que lo que hacen es evitar la propagación del virus una vez infectado. La actividad antiviral observada en el champiñón se debe principalmente a sus compuestos polisacáridos como ocurre en muchas otras especies de hongos.

Los hongos comestibles, incluyendo al champiñón, se pueden considerar como alimentos prebióticos es decir pueden ejercer el mismo efecto que algunos yogures, productos cárnicos y cereales que contienen polisacáridos llamados comúnmente como fibra bioactiva o dietética. Todos estos alimentos contienen realmente compuestos prebióticos que son aquellos compuestos no digeribles capaces de estimular de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de algunos microorganismos probióticos que habitan en el intestino, es decir solo estimulan el crecimiento de los microorganismos beneficiosos. Un tipo de esta fibra insoluble o fibra dietética es la quitina y las paredes celulares de los hongos están constituidas casi entre un 80 – 90% de quitina, luego los hongos son una buena fuente de fibra dietética aunque comparado con otros hongos como el *B. edulis* y el *P. ostreatus* por ejemplo, el champiñón no es la especie más rica en quitina (0,6 g/100 g) pero contiene otros polisacáridos considerados también como fibras dietéticas (1,9 g/100 g).

Además de la quitina, otros polisacáridos interesantes de los hongos son los β -glucanos ya que hay muchos estudios que los señalan como compuestos responsables de las actividades inmunomoduladoras y antitumorales observadas en algunas especies de hongos (*L. edodes*, *Ganoderma* sp., *F. velutipes*, etc). Los β -glucanos son capaces de inhibir la aparición de diversos tumores por diferentes mecanismos relacionados principalmente con la inhibición o activación de diferentes vías de regulación del sistema inmunológico (Gonzaga *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005). Desafortunadamente, el champiñón contiene estos compuestos en muy pequeña concentración (1,4 mg/100 g) aunque sí que contiene otros que recientemente también se han señalado como antitumorales y son las lectinas, unas glicoproteínas que al parecer son capaces de inhibir la proliferación de las células tumorales humanas del cáncer de colon.

Las setas pleurotas, las shiitake, algunas variedades de *Ganoderma* y otras pocas especies de hongos comestibles contienen también compuestos capaces de reducir los niveles de colesterol. Estos compuestos actúan de forma similar a los fármacos administrados a pacientes que padecen hipercolesterolemia, es decir inhiben la ruta biosintética de colesterol de nuestro organismo (Gunde Cimerman y Cimerman, 1995; Sugiyama *et al.*, 1995). De momento, no se ha estudiado si el champiñón contiene este tipo de compuestos. Los que sí se han estudiado son otros compuestos, que al parecer son exclusivos del champiñón y que son capaces de suprimir la propagación de la ascitis tumoral en ratones. También se ha demostrado que sus enzimas oxidativas (las tirosinasas

que pardean al champiñón si se daña) y los productos resultantes de su oxidación, son capaces de evitar el daño oxidativo que producen sobre el DNA ciertos compuestos mutagénicos (Shi *et al.*, 2002). Y además contienen otro tipo de compuestos, aún sin identificar, que son capaces de inhibir enzimas como la aromatasas y la esteroide 5- α -reductasa, relacionadas con la aparición del cáncer de mama y próstata.

Tras todo lo expuesto, se puede concluir que el champiñón contiene muchos compuestos bioactivos interesantes, lo único que podría depreciar sus cualidades es su baja concentración dentro del cuerpo fructífero, que haría que en algunos casos probablemente fuera insuficiente para ejercer el supuesto efecto beneficioso. Pero, hoy en día, éste es un problema fácilmente solucionable ya que se dispone de tecnologías muy avanzadas para aumentar su efectividad de varias maneras. Una sería, por ejemplo, adicionar compuestos específicos al sustrato de forma que durante su cultivo el champiñón absorbiera los compuestos beneficiosos en mayores cantidades (Spolar *et al.*, 1999). Otra sería preparar concentrados o extractos bioactivos del champiñón extrayendo de forma selectiva solo aquellos compuestos que tengan propiedades beneficiosas usando técnicas específicas como cromatografía o extracción con fluidos supercríticos etc. para la adición de estos preparados a otro tipo de alimentos. La preparación de estos concentrados tienen la ventaja de que los compuestos bioactivos se pueden obtener de sub-productos del cultivo, dejando los champiñones de mejor calidad para el consumo y valorizando sus desechos. Luego el champiñón es una fuente de compuestos bioactivos que puede ser utilizado para diseñar nuevos alimentos funcionales de interés comercial.

REFERENCIAS

- Barros, L., T. Cruz, et al. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 2742-2747.
- Barros, L., S. Falcão, et al. (2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry* **111**: 61-66.
- Barros, L., M. J. Ferreira, et al. (2007). Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **103**: 413-419.
- Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews* **54**: S91-S93.
- Delaquis, P. and G. Mazza (1997). Functional vegetable products. In: *Functional foods. Biochemical & processing aspects*. G. Mazza. Lancaster, Technomic.
- Dubost, N. J., R. B. Beelman, et al. (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **8**: 215-222.
- Dubost, N. J., B. Ou, et al. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry* **105**: 727-735.
- Eo, S.K., Kim, Y.S. et al. (2000). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology* **72** :475-481.

- Ey, J., E. Schömig, et al. (2007). Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 6466-6474.
- Ferrari, C. K. B. and E. A. F. S. Torres (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57**: 251-260.
- Franzoni, F., R. Colognato, et al. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**: 453-457.
- Gonzaga, M. L. C., N. M. P. S. Ricardo, et al. (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers* **60**: 43-49.
- Gunde Cimerman, N. and A. Cimerman (1995). Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase - lovastatin. *Experimental Mycology* **19**: 1-6.
- Harrowven, D. C., M. C. Lucas, et al. (2001). The first total synthesis of (\pm)-1-desoxyhypnophilin. *Tetrahedron* **57**: 9157-9162.
- Hicks, K. B. and R. A. Moreau (2001). Phytosterols and Phytostanols: Functional Food Cholesterol Busters. *Food Technology* **55**: 63-67.
- Hirasawa, M., N. Shouji, et al. (1999). Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents* **11**: 151-157.
- Kim, G. Y., M. Y. Lee, et al. (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology* **5**: 1523-1532.
- Kitzberger, C. S. G., A. Smânia, et al. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* **80**: 631-638.
- Leung, M. Y. K., K. P. Fung, et al. (1997). The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology* **35**: 255-263.
- Minato, K., M. Mizuno, et al. (1999). Autolysis of *Lentinan*, an antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodes*, Shiitake mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 1530-1532.
- Ramírez-Anguiano, A.C., Santoyo, S. et al. (2007). Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 2272-2278.
- Ramirez-Anguiano, A.C. (2009) Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Santoyo, S., Ramirez-Anguiano, A.C. et al (2009) Improvement of the antimicrobial activity of edible mushroom extracts by inhibition of oxidative enzymes. *International Journal of Food Science and Technology* **44**: 1057-1064
- Shi, Y. L., I. F. F. Benzie, et al. (2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences* **70**:1595-1608.
- Spolar, M. R., E. M. Schaffer, et al. (1999). Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz[a]anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer Letters* **138**: 145-150.
- Sugiyama, K., T. Akachi, et al. (1995). Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Nutritional Biochemistry* **6**: 80-87.

- Tsai, S. Y., H. L. Tsai, et al. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology* **40**: 1392-1402.
- Zheng, R., S. Jie, et al. (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology* **5**: 811-820.

Tabla 1. Resumen de algunas patentes que describen el uso de hongos o preparados a base de hongos comestibles con propiedades bioactivas para el diseño de alimentos funcionales.

Patente	Año	Hongo	Descripción	Autores
JP9173013 y US5780097	1998	<i>Lentinula edodes</i>	Proceso de preparación de un extracto pulverizado de shiitake con el que conserva todos sus ingredientes activos	Tanaka Y.
JP2004248531	2004	no especificado	Método sencillo de producción de extractos para sazonar a base de hongos	Kazuhiro F. and Akio Y.
CN1140030	1997	Hongo Xianggu	Producción de un extracto líquido concentrado como aditivo saborizante nutritivo	Xinbang Y.
JP58081757	1983	no especificado	Extracción para producir "esencia de hongo" sin degradación de su valor nutricional	Tominaga et al.
JP2000004829	2000	Hongo Awabi, Agaricus, <i>Ganoderma lucidum</i>	Producción de extracto de hongos con sabor único que puede ser usado para la preparación de alimentos saludables	Hirao H.
KR9310887	1993	Hongo Pangaii	Preparación de un extracto para su adición a varios alimentos y reducir el nivel de colesterol en los que lo consumen	Lee et al.
CN1301502	2001	Pies de Shiitake	Producción de una bebida especial con lentinan pulverizado y fibra de hongos	Chen W.
CN1036884	1989	Pies de Shiitake	Producción de galletas saludables de shiitake	Yang C.Y.
CN1340311	2002	Pies de Shiitake	Utilización económica de los pies de shiitake para la producción de snacks nutritivos similares al jerky	Liu et al.
CN1250624	2000	<i>Lentinula edodes</i>	Producción de una pasta nutritiva con sabor a pescado y beneficios para la salud de shiitakes	Yu et al.
CN1218637	1999	no especificado	Utilización de los residuos y hongos de mala calidad para la producción de salsa de hongos	Huang Z.
KR9512622	1995	<i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Coriolus versicolor</i>	Producción de alimentos saludables con actividad beneficiosa sobre las funciones del hígado	Kim and Yu
CN1117365	1996	<i>Collybia velutipes</i>	Producto con efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de cáncer adecuado para adultos y senior-adultos con enfermedades crónicas	Xingrong Y.
US Patent Application 20040175396	2004	<i>Hericum erinaceum</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Hypsizygus marmoreus</i>	Producción de extractos de hongo que estimulan el crecimiento de los nervios	Ohnogi H.
RU2167665	2000	Hongos Black birch	Producto a base de hongos enriquecido en complejos polifenol-carboxílicos biológicamente activos que puede ser usado para preparaciones terapéuticas o profilácticas y como aditivos alimentarios	Bredneva N.D., Shchegolev A.A., Larionov L.P.
RU2259841	2004	Hongo Birch	Efficient production of dry extract of birch fungus to be used as a dietary supplement.	Tsoj G.A., Kobiashvili G.A., Metlenkin A.A.

CN1176756	1998	Hericum, Genoderma, Matsutake Poria cocos, <i>Lentinus edodes</i> , Dictyophora, Gastroboletus, <i>Gastrodia elata</i> , Morchella, golden fungus y hongo long rooted	Líquido nutritivo y saludable producido a partir de hongos comestibles rico en aminoácidos, germanio orgánico, polisacáridos y microelementos efectivo para estimular la inmunidad y prevenir el cáncer	Xie Y.
CN1651041	2005	<i>Agaricus blazei</i>	Extracto soluble en agua producido a partir de esporoforos y micelio de hongos brasileños que suprimen el crecimiento de células tumorales y estimula la inmunidad	Zhou T. and Chen J.
KR9310887	1993	Hongo Pangii	Producto que solo o añadido a varios alimentos reduce el colesterol en sangre	Lee et al.
US Patent Application 20050180991	2005	<i>Tricholoma matsutake</i>	El extracto y el alimento preparado tiene una fuerte actividad biológica como reductor de la presión sanguínea	Matsunaga K.
JP2001069939	2001	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Cortinellus shiitake</i> , <i>Lyophyllum ulmarium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Grifola albicans</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Pholiota nameko</i> , <i>Lyophyllum decastes</i> , <i>Hericum erinaceum</i>	Extracto líquido de hongo que se produce como alimento saludable	Aoki and Kudo
JP11152230	1999	<i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pholiota nameko</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Tricholoma shimeji</i>	Producto que proporciona efectos suficientes simplemente por su administración oral, que puede ser utilizado como alimento beneficioso para la salud y puede ser producido con tecnologías baratas	Ikegawa T., Ikegawa A., Shimada F.
WO2005107496	2005	<i>Lentinus edodes</i>	Extracto novedoso y seguro capaz de modificar funciones inmunológicas	Soma et al.
JP2004057183	2004	Hongo Agaricus	Producción de un extracto soluble en agua a base de hongos Agaricus con actividad antitumoral y fácil absorción de sus ingredientes bioactivos	Yafuji M.
JP2001112438	2001	Hongo Agaricus	Proceso para la producción eficiente de un extracto con actividad antitumoral y de gran utilidad para aplicaciones industriales	Yamashita et al.
US Patent Application 20020164352	2002	uno o mas hongos comestibles	Producto que contiene quitosano y puede ser utilizado con propósitos dietéticos y/o terapéuticos	Donatini B.
RU 2007449	1994	<i>Agaricus bisporus</i> D49	Cepa de estructuras somáticas del hongo macroscópico <i>Agaricus bisporus</i> como productor de sustancias bioactivas para la obtención de esporoforos con cantidades elevadas de varios compuestos	Pjataeva M.I.

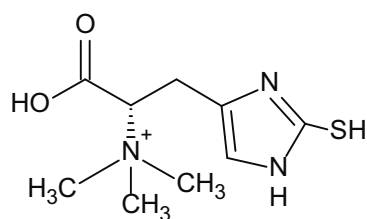


Figura 1. Estructura molecular de la ergotioneína.

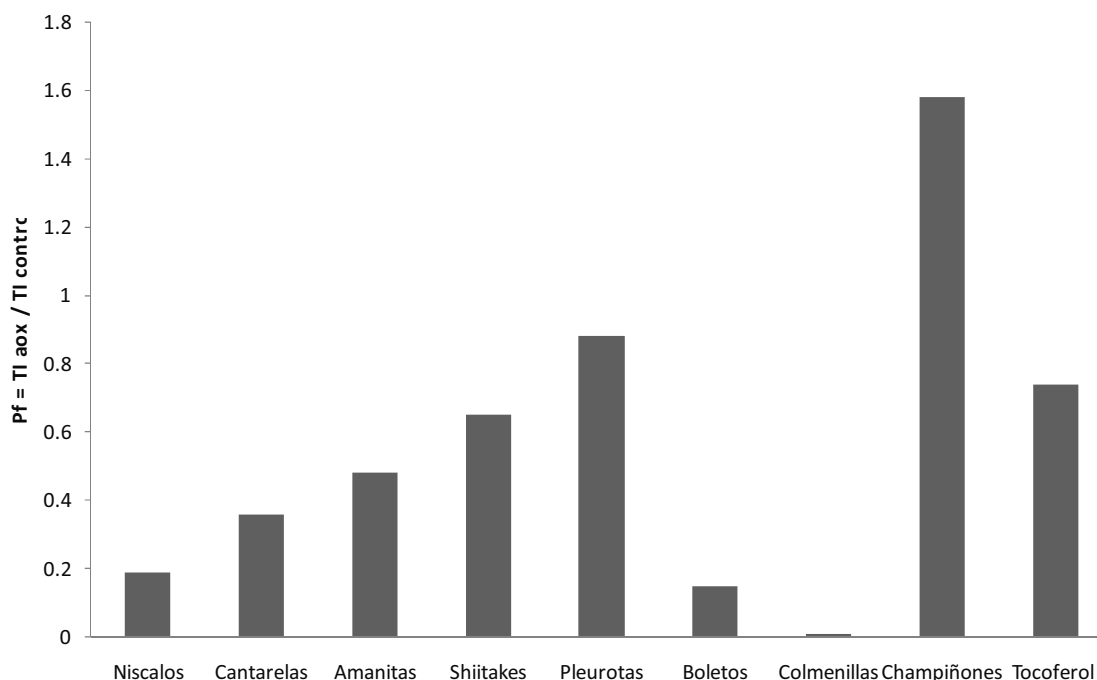


Figura 2. Actuación de extractos metanolicos de hongos como inhibidores de la formación de peróxidos (actividad como antioxidantes de matrices alimentarias lipídicas). El efecto de las muestras en retrasar la oxidación del aceite que se expresa como factor de protección (Pf) y se calcula según la ecuación $Pf = \text{Tiempo de inducción de la oxidación del aceite con antioxidante} / \text{Tiempo de inducción del aceite control (sin antioxidante)}$ (Ramirez-Anguiano, 2009).

Champiñón como una alternativa al aporte de selenio en la dieta

M. Pérez Clavijo, C. Urbina Sáenz, C. Clavijo Sáenz

Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja. Ctra. Calahorra, Km 4. 26560 Autol. La Rioja.

INTRODUCCIÓN

Aunque tradicionalmente ha sido conocido por su toxicidad, el selenio es un elemento esencial para humanos (McKenzie *et al.*, 1998; Beelman *et al.*, 2003; Spauling and Beelman, 2003; Beelman, 2005) y animales (Oblitas *et al.*, 2000; Rácz and Oldal, 2000) ya que es un cofactor necesario para diferentes sistemas enzimáticos. Por ello su mecanismo de acción es complejo (Rayman, 2000).

Los compuestos de selenio, en particular los compuestos orgánicos, son considerados compuestos de interés químico y biológico. Tienen propiedades físicas y químicas similares a sus homólogos organosulfurados. Desde el punto de vista nutricional, son de particular interés los ácidos selenoaminocarboxílicos, los péptidos que contienen selenio y los derivados seleníferos de ácidos nucleicos que se encuentran en los cuerpos celulares y tejidos (Rácz and Oldal, 2000).

Como constituyente de las selenoproteínas, tiene funciones enzimáticas y estructurales, siendo conocido también como antioxidante y catalizador de la hormona tiroidea (Spolar *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1998; Spauling and Beelman, 2003).

Desde 1969 existe una relación conocida entre la ingesta de selenio y la incidencia del cáncer. Desde entonces se han realizado numerosos estudios sobre su impacto en el cáncer, lo que le ha llevado a ser considerado como un posible anticarcinogénico (Spolar *et al.*, 1997).

Es esencial para el crecimiento y desarrollo normal. Puede prevenir miopatías asociadas con el estado nutricional en granjas. En ovejas y humanos se concentra en tejidos como el bazo, hígado y nódulos linfáticos (McKenzie *et al.*, 1998).

Deficiencias de este elemento pueden influir en la enfermedad de Keshan, asma atópico, enfermedad de Kashin-Beck, enfermedades coronarias, SIDA, aborto espontáneo, soriasis, cáncer de piel, cretinismo mixodematoso (McKenzie *et al.*, 1998), función inmune reducida, algunos tipos de cáncer, artritis, Alzheimer, enfermedades víricas, cardiopatía dilatada, miopatía musculoesquelética u osteoartropatía. La mayor parte de las personas tienen una deficiencia marginal de selenio (Beelman, 2005).

La ingesta de Selenio por la población depende del contenido en Selenio de los alimentos ingeridos.

El Selenio entra en la cadena alimentaria a través de las plantas. La concentración del Selenio en suelos, es generalmente baja (de 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), aunque en algunas áreas puede incluso llegar a 1250 mg/Kg , como es el caso de Irlanda (Reilly, 2006). Así pues, la ingesta

en la dieta presenta variaciones en función de la geografía debido a diferencias en la biodisponibilidad del Selenio, que generalmente es baja en Europa. Las cantidades de selenio ingeridas diariamente en los países europeos están descendiendo porque la biodisponibilidad del Selenio ha disminuido en áreas susceptibles de lluvia ácida o fertilización artificial excesiva, lo que reduce la absorción del mineral por la planta.

La suplementación con selenio puede proporcionar una protección adicional frente a algunas enfermedades (McKenzie *et al.*, 1998), pudiendo reducir la incidencia de cáncer gastrointestinal, de próstata y de pulmón; disminuir la actividad neutrófila e incrementar la producción de proteína quimioatrayente de monocitos en la vejez; proteger contra la hepatitis B; mejorar la movilidad del esperma en hombres poco fértiles; disminuir la peroxidación en lípidos tras la exposición UV (McKenzie *et al.*, 1998). En animales, la deficiencia metabólica de Selenio provoca una disminución en la actividad GSH-Px (Glutación Peroxidasa), que se asocia a mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y consecuentemente a diversos síndromes asociados a su déficit nutricional, como la enfermedad del músculo blanco, debilidad neonatal, miopatía cardíaca, retención de placenta, abortos, degeneración testicular, inmunosupresión y mastitis. Para asegurar un aporte adecuado o controlar estos problemas se utiliza la suplementación con sales inorgánicas o compuestos orgánicos de selenio, siendo el selenito de sodio el más utilizado (Oblitas *et al.*, 2000).

El Selenio consumido a través de los alimentos y mediante suplementación se presenta como selenometionina (fuentes animales y vegetales), selenocisteína (principalmente fuentes animales), selenato y selenito (principalmente suplementos). La biodisponibilidad y la distribución en los tejidos dependen de la forma ingerida (Rayman, 2000).

Fuentes moderadas de Selenio son cangrejo, hígado, marisco y pescado. En EEUU la harina es una buena fuente, pero esto no sucede en Europa, por la baja disponibilidad de Selenio en sus suelos (Rayman, 2000; Vázquez *et al.*, 2006).

Comparando el champiñón con algunas hortalizas, su contenido en selenio es muy superior, como puede observarse en la Figura 1.

Los niveles de Selenio en aguas son normalmente bajos, menores de 1µg/L en agua potable. En agua de mar, los niveles son diez veces menores. Las concentraciones pueden ser mayores en aguas provenientes de pozos y especialmente en algunos ríos, en áreas seleníferas (Reilly, 2006).

Desde hace tiempo se sabe que los hongos contienen cantidades significativas de Selenio (Spaulding and Beelman, 2003). Dicho contenido oscila entre 0,46 y 5,63 mg de selenio por Kg de champiñón sobre materia seca (sms), en función de la variedad (Clement, 1998). El champiñón tiene normalmente entre 1 y 2 mg por Kg sms de Selenio, lo que lo hace una buena fuente de Selenio dietético, ya que ese porcentaje representa el 15% de la ingesta recomendada diaria en EEUU. Cualquier alimento que tenga más del 10% de esta cantidad diaria recomendada en una ración está considerado como una buena fuente de productos nutritivos, en EEUU (Beelman *et al.*, 2003; Spaulding and Beelman, 2003; Beelman, 2005). Para ser considerado una excelente fuente de Selenio debería proporcionar un 20% de la cantidad diaria recomendada.

El contenido en Selenio de los hongos varía mucho en función de la cantidad de Selenio que hay en el sustrato y esto depende del origen de las materias primas (Beelman, 2005).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que, aunque es necesaria una dosis adecuada de Selenio, tampoco hay que fomentar el sobre consumo. Éste es un mineral tóxico con un pequeño intervalo terapéutico. En algunos individuos más sensibles, la dosis máxima segura de ingesta es de sólo 600 µg/día, por lo que sería prudente restringir la ingesta a un nivel máximo de 400-450 µg/día como recomiendan varios expertos (Rayman, 2000; Spaulding and Beelman, 2003).

El reconocimiento de las propiedades anticancerígenas del selenio, junto con la habilidad del champiñón para acumular dicho elemento, crea un hueco en el mercado para los hongos enriquecidos en Selenio (Oblitas *et al.*, 2000).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de champiñón

En las salas experimentales del Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja (CTICH) se han llevado a cabo diferentes ensayos de cultivo de champiñón en condiciones climáticas controladas, bajo la metodología habitual de trabajo y manejo de cultivo con el fin de analizar el contenido natural en selenio de dichos champiñones, del sustrato empleado para su cultivo, así como de las materias primas empleadas. Se han realizado las siguientes variaciones:

- Cultivo de champiñón con compost proveniente de las distintas Centrales de compostaje de Champiñón existentes en La Rioja.
- Ensayos de cultivo sobre un mismo tipo de compost pero con diferentes tipos de tierra de cobertura. Las coberturas estudiadas fueron: Mezcla Turba Negra-Turba Rubia 70/30 (TR + TN), 100% Turba Rubia (TR) y Mezcla Turba Rubia – SPCH 50/50 (TR + SPCH).
- Cultivo de diferentes variedades de champiñón: se estudiaron dos variedades.

Para la realización de estos ensayos, se ha contado con la colaboración de las Plantas de Compostaje de La Rioja a través de sus técnicos para la obtención de las materias primas, muestras e información sobre los procesos. Se ha registrado la cantidad y calidad de champiñón producido en cada uno de los ensayos así como las condiciones de cultivo.

Las muestras se analizaron mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) con ecuaciones desarrolladas en el CTICH en un equipo Foss NIRSystem 6500 (Pérez-Clavijo, 2005). Los parámetros analizados son: humedad, cenizas (% s.m.s), nitrógeno orgánico (% s.m.s), amoníaco (% N s.m.s), pH, conductividad (mS/cm) y relación C/N.

Además se testaron distintos materiales de cobertura, caracterizándose en pH, conductividad y capacidad de retención de agua.

Los parámetros analíticos medios obtenidos se muestran en la Tabla 1.

La comparación estadística entre las réplicas de cada ensayo se realiza mediante un análisis de varianza ANOVA para un factor y el Test de Duncan ($p < 0,05$) de comparación de medias.

Determinación de selenio

La determinación se realiza por Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (AAS-GH), previa digestión ácida por microondas. Se determina la señal de absorbancia del selenio a su longitud de onda característica. La absorbancia es proporcional a la cantidad de selenio presente en la muestra. La optimización y validación del método analítico se ha realizado en el CTICH (Urbina-Sáenz, 2009).

El champiñón se lavó con agua de boca y se escurrió. Posteriormente se eliminó el agua de lavado y se procedió a su laminado. El champiñón en láminas se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo a esta temperatura hasta su posterior deshidratación por liofilización. Después se procedió a la molienda de la muestra y el polvo obtenido se guardó en frascos de polipropileno sellados con teflón que se almacenaron en un armario desecador hasta su tratamiento posterior.

La técnica analítica seleccionada para situar el analito en condiciones adecuadas para su análisis es la digestión ácida asistida por microondas. Como medio de digestión se empleó ácido nítrico.

Para la determinación del selenio mediante AAS-GH se empleó como medio ácido de generación ácido clorhídrico y como agente reductor borohidruro de sodio estabilizado en hidróxido sódico.

Las matrices analizadas fueron: gallinaza, paja, compost de fase I y II, coberturas, SPCH y champiñón de primera, segunda y tercera florada.

Todas estas actuaciones están encaminadas a obtener una caracterización detallada de los diferentes materiales utilizados o generados en los distintos ensayos de cultivo, así como del champiñón obtenido.

RESULTADOS

Respecto al contenido en selenio de las materias primas y del sustrato postcultivo, los resultados obtenidos muestran que éste es bajo para todos ellos. El contenido hallado es igual o menor de 0,1 mg de selenio por Kg de paja sobre materia seca (sms), de 0,8 a 1,1 mg de selenio por Kg de gallinaza sms, de 0,3 mg de selenio por Kg de compost sms para fase I, 0,4 mg de selenio por Kg de compost sms para fase II, 0,7 mg de selenio por Kg de compost sms para el SPCH y $\leq 0,6$ mg de selenio por Kg de tierra sms para las tierras de cobertura ensayadas. Los datos se muestran en la Tabla 2 y la Figura 2.

Los resultados muestran una mayor concentración de selenio en el caso de las gallinazas, poniéndose de manifiesto que es la principal fuente de selenio para el compost.

Según se muestra en la Figura 3, se observan variaciones en función del tipo de gallinaza. Otros factores a tener en cuenta serían los ciclos de los pollos y su alimentación ya que esto puede influir en la composición final de la gallinaza y por lo tanto en la composición final del sustrato de cultivo.

En el caso de la paja el contenido es muy bajo, por lo que su contribución al nivel final de selenio en el compost es mínima, poniendo de manifiesto el bajo contenido en selenio del suelo de procedencia.

A la vista de los resultados obtenidos y como puede verse en la Figura 2, queda claro que el mayor aporte de selenio al cultivo se realiza mediante el compost a partir de la gallinaza. La tierra de cobertura también contribuye a dicho aporte, aunque en menor medida. Un 88% del selenio lo aporta el compost, mientras que la aportación de la tierra de cobertura es sólo del 12%.

El contenido medio de selenio hallado en las muestras de champiñón analizadas es de 2,15 mg se selenio por Kg de champiñón sms. Esta cantidad es del orden a la encontrada en la bibliografía para champiñón procedente de otros países.

Una vez realizado el estudio estadístico de la influencia de los factores estudiados en los resultados obtenidos de contenido de selenio en champiñón se puede afirmar que éste depende de varios factores.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el contenido de selenio hallado en champiñón obtenido en cultivos realizados con compost procedente de las diferentes plantas colaboradoras en el estudio. En la Figura 4 se representa el contenido medio de selenio obtenido en champiñón de segunda florada para tres plantas estudiadas.

Por otro lado, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre floradas dentro de un mismo ciclo de cultivo. Así mismo, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre floradas de diferentes ciclos, encontrándose significativa la interacción entre ambos factores ($p < 0,05$). En la Figura 5 puede observarse la variación del contenido en selenio obtenido en champiñón en función del ciclo de cultivo y la florada.

También se han detectado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en función de las tierras de cobertura empleadas (Figura 6) y respecto a la semilla empleada (Figura 7).

Además se estudió la absorción de selenio por parte del champiñón en función de la cantidad inicial de selenio aportada por las materias primas. El aporte medio de selenio entre el compost y la cobertura es de unos 5,6 mg de selenio por paquete. La absorción de selenio varía para cada ciclo de cultivo analizado como puede observarse en la Figura 8.

CONCLUSIONES

La mayor contribución en el contenido final de selenio del champiñón la realiza la gallinaza, con un 88% del selenio total inicial, mientras que la aportación de la cobertura es tan sólo del 12%.

El contenido medio de selenio hallado en champiñón cultivado en La Rioja es de 2,15 mg por Kg de champiñón sms.

El estudio realizado sobre la absorción de selenio por el champiñón revela que los factores estudiados (planta de compostaje, florada, ciclo de cultivo, cobertura y semilla) son estadísticamente significativos, y que por lo tanto influyen en el % absorbido.

El aporte medio de selenio por parte del compost y la cobertura es de 5,6 mg por paquete de compost. Así mismo el estudio de absorción realizado, revela que la absorción del selenio por el champiñón varía en cada ciclo de cultivo.

REFERENCIAS

- BEELMAN, R.B. (2005). Componentes biológicos en los champiñones (*Agaricus bisporus*) de importancia nutricional, medicinal o biológica. En: *Propiedades saludables del consumo del champiñón*. Actas de la I Jornada celebrada en Logroño el 16 de marzo de 2005 (SALICAL). Gobierno de La Rioja. pp. 23-31.
- BEELMAN, R.B., ROYSE, D.J. and CHIKTHIMMAH, N. (2003). Bioactive Components in *Agaricus bisporus* of Nutritional, Medicinal or Biological Importance. *Int. J. Med. Mush.* **5** (4): 321-337.
- CLEMENT, IP. (1998). Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. *Selenium and Cancer Prevention*: 1845-1854.
- McKENZIE, R.C., RAFFERTY, T.S., BECKETT, G.J. (1998). Selenium: an essential element for immune function. *Trends. Immunology Today* **19**(8): 342-345.
- OBLITAS, F., CONTRERAS, P.A., BOHMWALD, H. and WITTWER, F. (2000). Efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad sanguínea de glutación peroxidasa (GSH-Px) y ganancia de peso en bovinos selenio deficientes mantenidos a pastoreo. *Arch. Med. Vet.* **32**(1): 55-62.
- PÉREZ-CLAVIJO, M. (2005).
- RÁCZ L. and OLDAL V. (2000). Investigation of uptake processes in a soil/mushroom system by AES and AAS methods. *Microchemical Journal* **67**: 115–118.
- RAYMAN, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet* **356**: 233-41.
- REILLY, C. (2006). Selenium in Food and Health. Second Ed. Springer US. Chapter1.
- SPAULING, T and BEELMAN, R. (2003). Survey Evaluation Of Selenium & Other Minerals in *Agaricus* Mushrooms Commercially Grown In The United States. *Mushroom News* **51**(5): 6-9.
- SPOLAR, M.R., BEELMAN, R.B., ROYSE, D.J. and MILNER, J.A. (1997). Selenium-Enriched Mushrooms: A potential New Value-Added Product. *Mushroom News* **45**(9).

URBINA-SÁENZ, M.C. (2009). Aplicación de la metodología de diseño de experimentos a la determinación de selenio en muestras de champiñón por la técnica combinada Generación de Hidruros-Espectrofotometría de Absorción Atómica (GH-EAA). *DEA*.

VÁZQUEZ, C., ALCARAZ, F., MONTAGANA, M.C., GARRIGA, M. and SECOS, J. (2006). Contenido en selenio de algunos alimentos.
<http://www.fisterra.com/material/Dietetica/selenio.asp>.

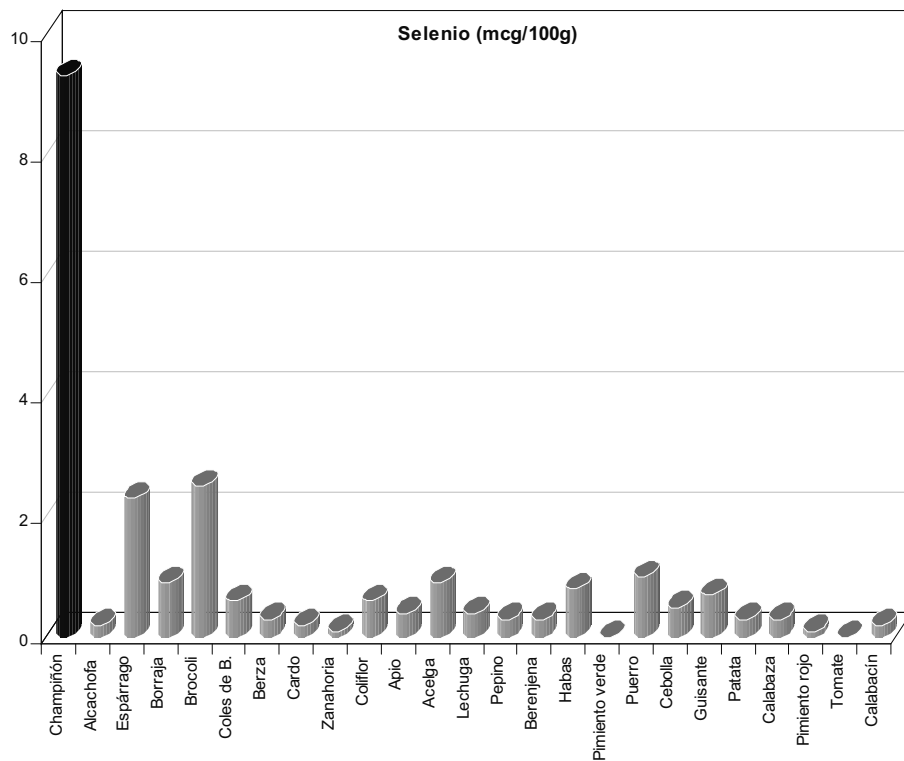


Figura 1.- Contenido en selenio en distintos alimentos (USDA).

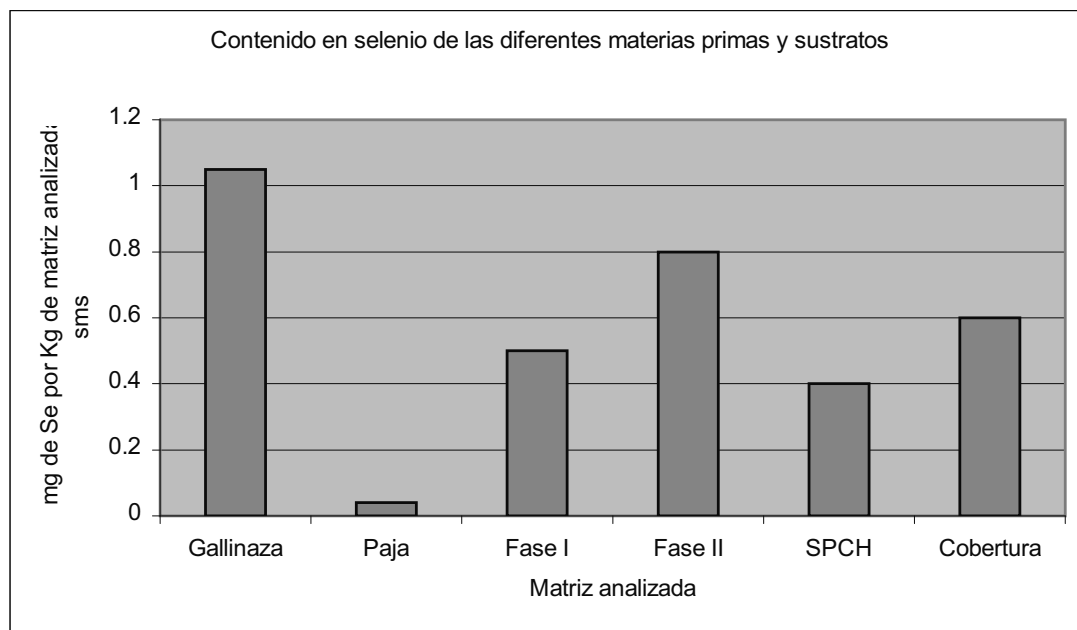


Figura 2. Representación del contenido en selenio de las diferentes matrices analizadas.

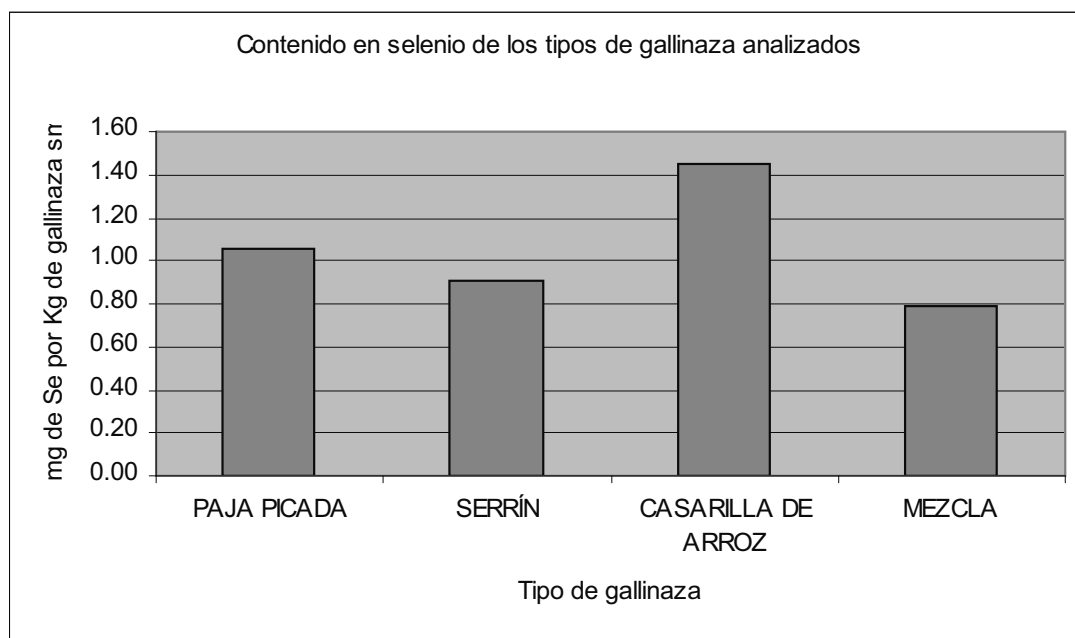


Figura 3. Representación del contenido en selenio en función del tipo de gallinaza analizada

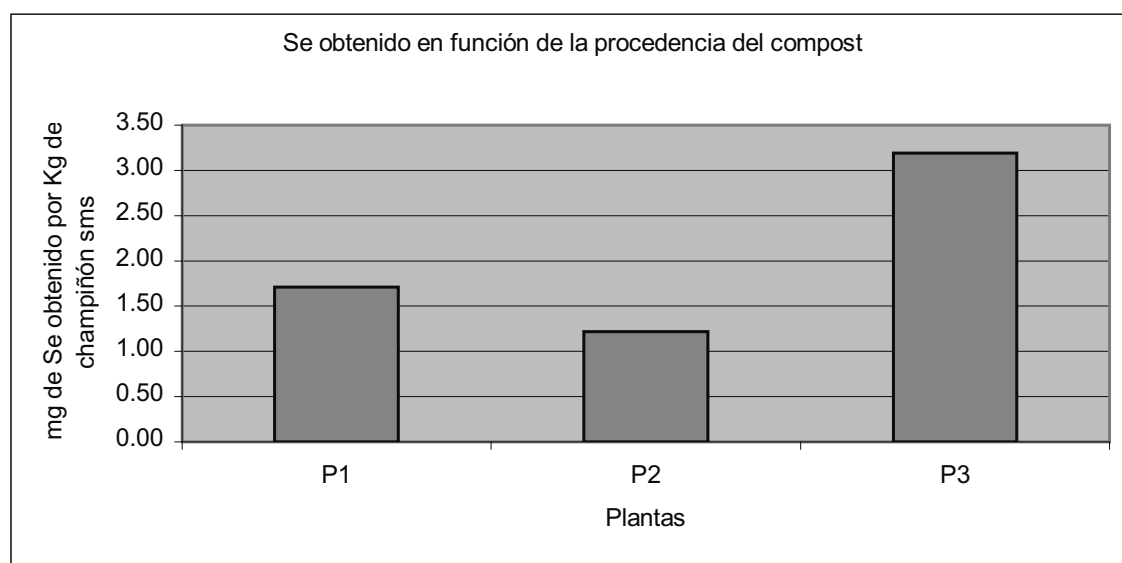


Figura 4. Representación del contenido de selenio en función de la procedencia del compost para segunda florada.

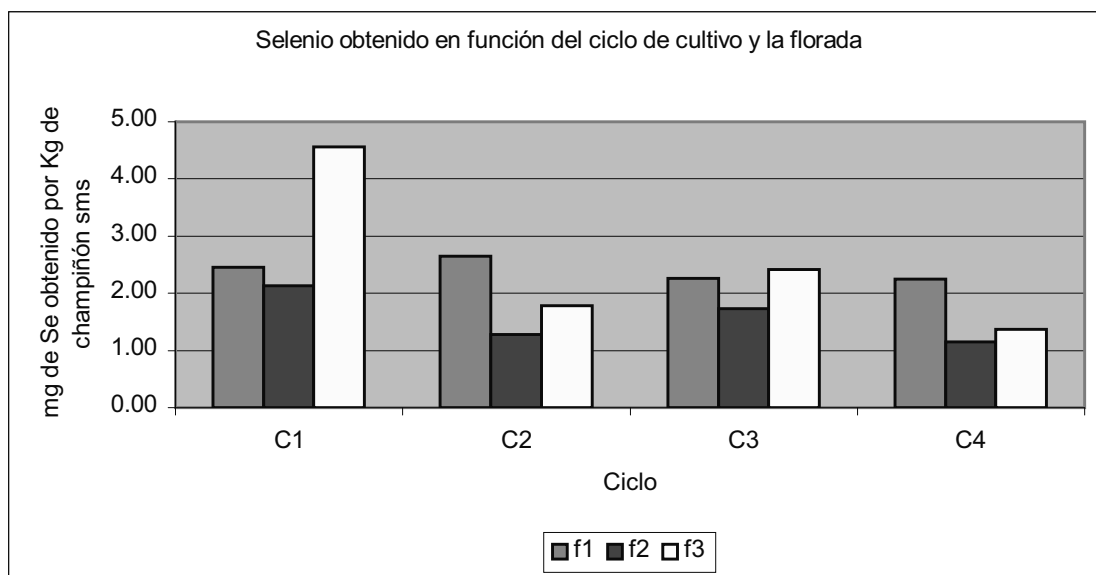


Figura 5. Representación de la variación del contenido en selenio obtenido en champiñón en función del ciclo de cultivo y la florada.

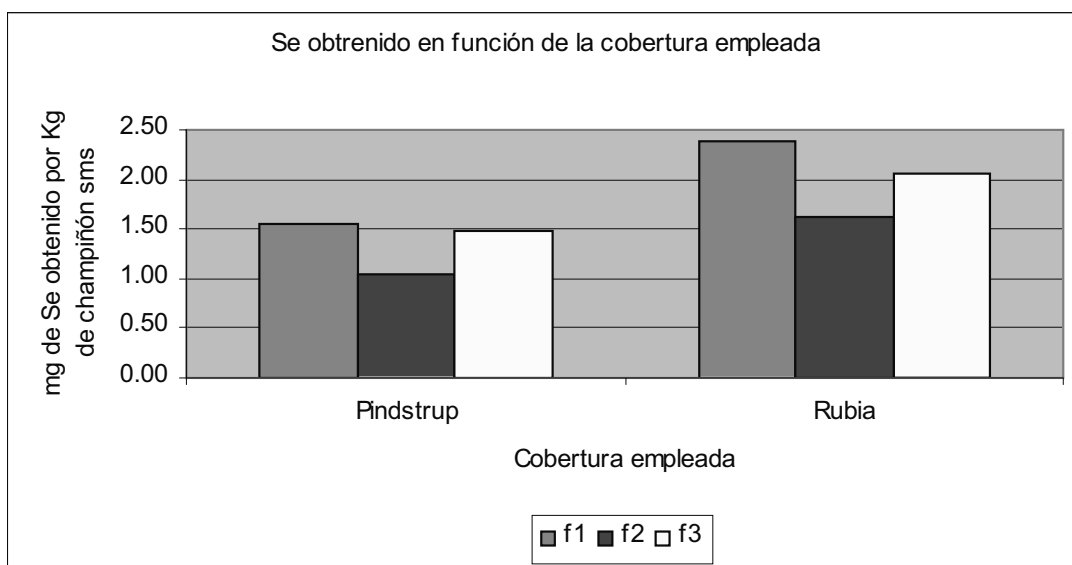


Figura 6. Representación del contenido en selenio obtenido para champiñón en función de la cobertura empleada para las tres primeras floradas.

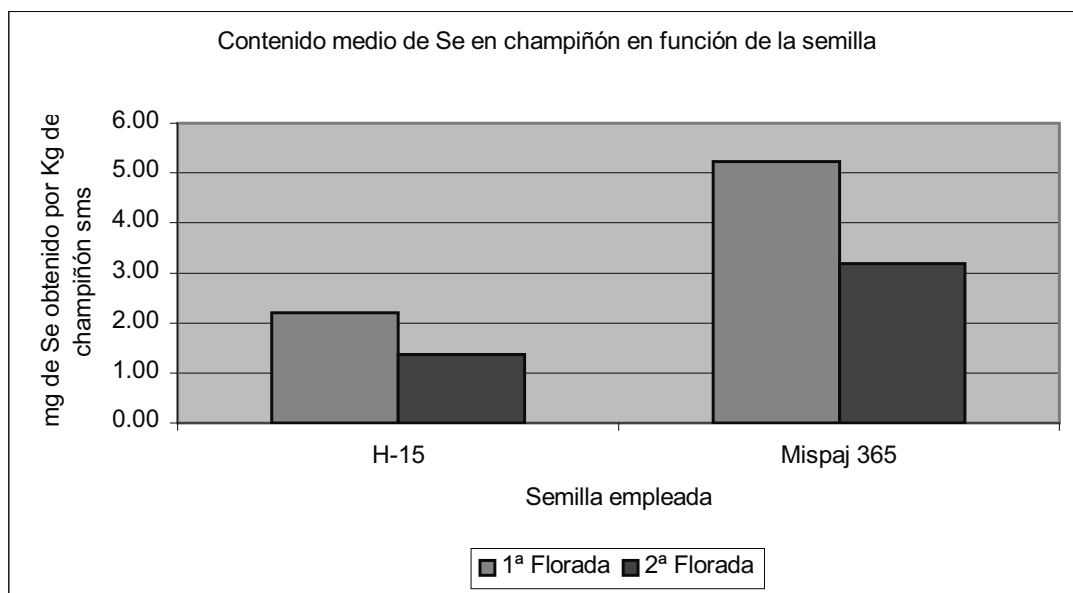


Figura 7. Representación del contenido medio de selenio obtenido en champiñón en función de la semilla empleada para las dos primeras floradas.

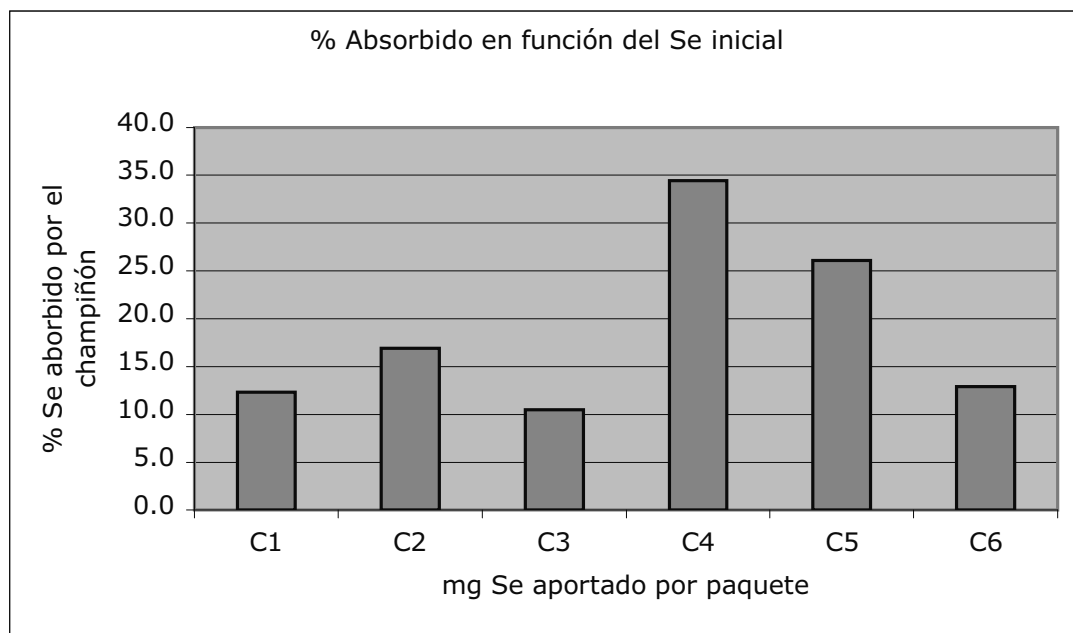


Figura 8. Representación del selenio absorbido en función del selenio inicial

Tabla 1.- Parámetros analíticos medios obtenidos en la caracterización del compost y materias primas empleados y de los sustratos generados.

MUESTRA	Valores medios	pH	C.E. 1/5 (mS/cm)	Humedad (%)	Cenizas (% sms)	N total (%sms)	Amonio (%N sms)	M.O. (% s.m.s)	Relación C/N
Compost	Media	8.1	5.9	73.6	22.2	2.1	0.39	77.8	22.5
Fase I	Desv.	3.3	13.9	1.6	8.0	6.7	32.3	2.2	16.6
Compost	Media	7.5	6.6	68.3	27.2	2.3	0.01	72.7	18.2
Fase II	Desv.	2.7	9.8	2.5	7.7	3.6	145.	2.9	5.6
Turba	Media	7.8	0.48	77.1	32.9	1.1		67.0	37.0
	Desv.	2.5	59.2	11.1	45.9	28.4		22.5	43.1
SPCH	Media	7.5	50.0	36.2	8.2	7.4		20.8	23.8
	Desv.	33.4	52.2	52.2	145	141		100	58.1

Tabla 2. Contenido en selenio hallado en las materias primas y sustratos generados.

Muestra	mg Se por Kg de compost sms
Fase I	0.5
Fase II	0.8
SPCH	0.6
TN + TR	0.2
TR	0.4
TR + SPCH	0.5
Gallinaza (Paja Picada)	1.1
Gallinaza (Serrín)	0.9
Gallinaza (cascarilla de arroz)	1.5
Gallinaza(Mezcla)	0.8
Paja (Soria)	<0.1

Champiñón laminado. Refrigeración, lavado y envasado.

Ana Simón

Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario. Gobierno de la Rioja. Crta. Logroño-Mendavia km 87, 26071 Logroño. E-mail: postcosecha.cida@larioja.org

INTRODUCCIÓN

La comercialización del champiñón laminado responde a la actual demanda de productos listos para usar o mínimamente procesados, permitiendo una mayor comodidad de uso y un mayor valor añadido.

El champiñón entero tiene ya de por sí una vida útil postcosecha muy corta, asociada a su elevada actividad respiratoria y metabólica. Pierde calidad debido al proceso de desarrollo con la apertura del sombrero y el crecimiento del pedúnculo, la rápida deshidratación, el pardeamiento de la superficie del carpóforo, los cambios texturales y el ataque microbiano producido después de la recolección por las bacterias *Pseudomonas tolasii* que da lugar a la mancha bacteriana.

La operación de laminado puede aumentar la pérdida de calidad. El desarrollo del champiñón laminado se manifiesta en la deformación de las láminas debido a la apertura del sombrero, la aparición de las laminillas oscuras y el crecimiento del pedúnculo. También aumenta con el laminado la superficie susceptible de deshidratación, pardeamiento y ataque microbiano. Sin embargo se ha visto que no hay un aumento importante de la actividad respiratoria por efecto del corte, como ocurre con otros productos (Cliffe-Byrnes y O'Beirne, 2007)

Las operaciones que pueden influir en mayor medida en el mantenimiento de la calidad y en la vida útil del champiñón laminado son las condiciones de refrigeración y humedad relativa, el lavado higienizante y el envasado adecuado.

CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN Y HUMEDAD RELATIVA

La temperatura a que son sometidos los champiñones después de la recolección es el factor que más influye sobre su calidad porque determina la velocidad de todos los procesos degenerativos. La vida útil del champiñón a temperatura ambiente viene a ser de uno o dos días, y la primera condición para aumentar el tiempo de almacenamiento del champiñón en condiciones de frescura, es la refrigeración junto con la humedad relativa elevada, a lo largo de todo el proceso, desde la recogida a la venta al consumidor.

La temperatura influye mucho sobre el proceso de desarrollo del champiñón, de manera que a 4-5 °C se han mantenido los champiñones cerrados durante 7 días mientras que a 10 °C solo han aguantado 2 ó 3 días (Simón y Gurría, 1998). El desarrollo del champiñón influye mucho en la apariencia del champiñón laminado, en el que pueden

aparecer las láminas retorcidas y con las laminillas oscuras expuestas. En la fotografía 1 se observa este aspecto en champiñón laminado mantenido a 5 °C y 9 °C durante cinco días.

La actividad respiratoria de los champiñones, tanto enteros como cortados, aumenta al incrementarse la temperatura de almacenamiento y esto repercute sobre la composición de las atmósferas modificadas creadas en los envases de este producto.

La temperatura también influye sobre el crecimiento microbiano. En la figura 1 están representados los recuentos de *Pseudomonas* de un ensayo realizado con champiñón laminado, envasado en bandejas recubiertas con film de PVC perforado y almacenadas a 3 °C y 9 °C durante 13 días (González-Fandos *et al.*, 2006). Los recuentos iniciales fueron ya muy elevados (7,8 log ufc/g) y alcanzaron valores del orden de 9 y 10 log ufc/g a 3 °C y 9 °C respectivamente. Estos valores fueron del mismo orden que el de los microorganismos mesófilos y bastante por encima del límite que pone la legislación española de 7 unidades logarítmicas de mesófilos para vegetales crudos envasados (Real Decreto 3484/2000).

La disminución de *Pseudomonas* a 3 °C respecto a los 9 °C, que fue del orden de un ciclo logarítmico, se reflejó en la incidencia de mancha bacteriana. Ésta fue severa a los 9 días en los champiñones mantenidos a 9 °C, mientras que a 3 °C solo se observó una moderada incidencia a los 13 días.

A 3 °C también se ha observado un menor oscurecimiento de las láminas que a 9 °C, aunque esta alteración no es tan importante como en el champiñón entero. En éste, el pardeamiento se produce en mayor medida en la superficie del sombrero donde es mayor el contenido de polifenoles y la actividad enzimática (Figura 2).

La deshidratación de los champiñones se reduce en primer lugar manteniéndolos con una humedad relativa elevada (85-90%) y para una determinada humedad relativa, la temperatura ejerce una influencia notable sobre la pérdida de peso por deshidratación. Según algunos autores, la pérdida de peso para una humedad relativa del 80% es 2,5 veces más rápida a 15 °C que a 2 °C. La humedad relativa alta se puede alcanzar en las cámaras frigoríficas equipadas para este fin o mediante el envasado con films semipermeables que reduzcan la pérdida de agua.

La temperatura recomendada para mantener el champiñón durante toda la etapa desde la recolección hasta su venta es de 0-5 °C, cuanto más baja mayor será el tiempo de vida útil. Las condiciones óptimas de temperatura a lo largo del proceso postcosecha serían: 1 Preenfriamiento rápido hasta la temperatura de conservación que podría ser de 2 °C. 2 Mantenimiento en cámara frigorífica a 2 °C y humedad relativa elevada (80-90%) durante el menor tiempo posible. 3 Transporte frigorífico a la misma temperatura hasta el lugar de venta. 4 Mantener los champiñones en estantes refrigerados a temperatura no superior a 5 °C para alcanzar una vida útil que puede ser de 7 a 9 días. Además, teniendo en cuenta que la humedad relativa de estos estantes es baja, el tiempo que puedan estar los champiñones sin excesiva deshidratación dependerá de que estén o no protegidos por un envase adecuado.

LAVADO HIGIENIZANTE

El champiñón recolectado contiene restos de tierra adheridos especialmente al pedúnculo, y una población bacteriana muy elevada, principalmente de *Pseudomonas*.

En la elaboración del champiñón laminado se corta parte del pedúnculo eliminando gran parte de la tierra, pero quedan restos en el champiñón que convendría eliminar para presentar un producto limpio. Esto se podría conseguir mediante un lavado apropiado a la delicada naturaleza del champiñón, que se aplicaría en el champiñón entero con el pedúnculo cortado y antes de laminarlo.

El lavado de los champiñones con agua sola afecta negativamente a la conservación posterior, debido a que el agua absorbida por los champiñones daña a las hifas, favoreciendo el crecimiento bacteriano e incrementando la incidencia de mancha bacteriana. Por eso se ha ensayado la adicción al agua de lavado de numerosos compuestos antimicrobianos y/o inhibidores del pardeamiento enzimático, con el fin de reducir la carga microbiana y evitar el pardeamiento. A continuación se hace referencia a los compuestos que mejores resultados han dado.

El peróxido de hidrógeno al 5% ha sido propuesto por Sapers *et al.* (1994, 2001) para usarlo como antimicrobiano en el lavado de champiñón entero o cortado. Este tratamiento seguido de la acción de una mezcla de inhibidores del pardeamiento consiguió prolongar la vida útil de los champiñones. El efecto antimicrobiano de este compuesto ha sido también comprobado por Cliffe-Byrnes y O'Beirne (2008) en el lavado de champiñones enteros con destino a ser laminados. No obstante, el peróxido de hidrógeno no está contemplado en la legislación europea como aditivo alimentario.

La eficacia antimicrobiana del peróxido de hidrógeno, resultó similar a la de compuestos como el ácido cítrico y el EDTA, en los trabajos realizados por Brennan y Gormley (1998). Según estos autores, el lavado de los champiñones enteros con cada uno de estos compuestos produjo una reducción importante de las *Pseudomonas* y de la mancha bacteriana en el champiñón laminado.

La elección entre estos tres compuestos viene determinada por su seguridad como aditivos alimentarios, y en este sentido el ácido cítrico es el que no presenta ningún impedimento legal.

En el CIDA se ha ensayado un procedimiento de lavado con ácido cítrico consistente en sumergir totalmente los champiñones con el pie cortado, en una solución de 10 g/l durante cinco minutos. A continuación se sumergieron en agua durante tres minutos con el fin de aclararlos. Se aplicó una agitación muy suave para favorecer la separación de las partículas de tierra pero evitando los roces que pudieran deteriorar la superficie de los champiñones al oscurecerse. Después se dejaron escurrir sobre papel absorbente durante 10 minutos antes de ser laminados.

Como se ve en la tabla 1, este sistema produjo en el champiñón laminado una reducción de *Pseudomonas* de 2,4 y 1,6 ciclos logarítmicos respecto al no lavado en el día inicial, en los experimentos 1 y 2 respectivamente (Simón y González-Fandos, 2009a) Esta

reducción fue del mismo orden que la obtenida por Brennan *et al.* (2000) con una mayor concentración de ácido cítrico (40 g/l). Sin embargo, con una concentración del 0,5 g/l se redujo mucho la acción antimicrobiana. Esta reducción se mantuvo de manera importante a lo largo del almacenamiento.

En los lavados con agua se produjo una pequeña disminución inicial de las *Pseudomonas*, pero el crecimiento de éstas durante el almacenamiento, favorecido por la absorción de agua, hizo que los recuentos alcanzaran valores del mismo orden que en los champiñones no lavados.

Como consecuencia del efecto antimicrobiano producido por el lavado con ácido cítrico en las condiciones anteriormente expuestas, no se observó mancha bacteriana en los champiñones así tratados durante los 13 días de almacenamiento a 3 °C. En los champiñones no lavados o lavados con agua, la incidencia de mancha bacteriana fue severa o extrema en el experimento 1 y entre moderada y severa en el experimento 2 a los 13 días de almacenamiento (Tabla 2).

También se observó que la mancha bacteriana fue más intensa en el experimento 1 que en el 2, en los tratamientos ‘sin lavar’ y ‘lavados con agua’, como corresponde al mayor recuento microbiano registrado en el primer caso. Sin embargo, el lavado con cítrico fue eficaz en los dos casos pues no se observó mancha bacteriana en ninguno de ellos.

Según nuestros resultados, que confirman los de otros autores, a temperaturas de 3-5 °C, la mancha bacteriana se empezó a notar a partir de 8-9 días en champiñones no lavados o lavados con agua, dependiendo de la carga microbiana inicial. A partir de este tiempo, es cuando se pone de manifiesto el efecto beneficioso del lavado con ácido cítrico en relación con la aparición de mancha bacteriana a temperaturas de 3-5 °C.

El lavado del champiñón entero con ácido cítrico, en las condiciones referidas, tiene el inconveniente de que oscurece el color de la superficie del carpóforo, por lo que no es recomendable por sí solo para champiñones enteros. Este oscurecimiento se ha reflejado en los bordes del champiñón laminado, pero en una evaluación de la apariencia por un panel de catadores han sido valorados dentro de niveles aceptables.

Como se ve en la tabla 3, los champiñones no lavados tienen una aceptación más alta que los lavados en el primer día. La aceptación en los no lavados disminuyó a lo largo del almacenamiento de manera que a los 13 días alcanzó un valor inferior a 5 que es el considerado como límite de aceptabilidad. En este día los champiñones sin lavar se vieron afectados por la mancha bacteriana. Sin embargo, en los champiñones lavados se mantuvo el nivel de aceptación durante todo el almacenamiento en torno a 6,1-6,9 que son valores por encima del límite. En estos champiñones se apreció el borde ligeramente más oscurecido, lo que rebajó la aceptación en comparación con los no lavados en el día primero pero se mantuvieron en un nivel aceptable posteriormente porque no apareció mancha bacteriana.

Para reducir o eliminar el efecto negativo sobre el color del champiñón producido por el lavado con ácido cítrico, se ha experimentado este tratamiento de lavado seguido del

aclarado con soluciones de compuestos inhibidores del pardeamiento como son los derivados del ácido ascórbico (D- isoascorbato de sodio y L-ascorbato de sodio). Con ello se pretendió aprovechar el efecto antimicrobiano del ácido cítrico a la vez que se evitara el oscurecimiento.

El experimento realizado en el CIDA ha consistido en el lavado del champiñón con ácido cítrico 10g/l como se ha indicado anteriormente, pero sustituyendo el aclarado con agua durante tres minutos por la inmersión en soluciones de D-isoascorbato de sodio y L-ascorbato de sodio de 1% y 1,5% cada uno de ellos. Estos cuatro tratamientos se han comparado con el lavado con cítrico seguido por aclarado en agua y con el no lavado (Simón y González-Fandos, 2009b)

En la figura 3 se representan los parámetros de color L*, a* y b* medidos en el sombrero de los champiñones sometidos a los seis tratamientos indicados y almacenados en bandejas recubiertas de PVC perforado, a 5 °C durante 14 días.

Los champiñones lavados con cítrico y aclarados con agua (B) presentaron los mayores cambios de los tres parámetros de color respecto a los no lavados (A). Los valores de L* fueron inferiores en B, lo que significa un mayor oscurecimiento. Los valores de a* y b* fueron mas elevados en B que en A, lo que significa un aumento de la tonalidad rojizo-amarillenta. Los aclarados con los ascorbatos atenuaron en mayor o menor medida estos cambios siendo el tratamiento de L-ascorbato de sodio al 1,5% el más eficaz en cuanto a la alteración del color.

En los recuentos de *Pseudomonas* se observó que los ascorbatos disminuyeron un poco el efecto antimicrobiano del ácido cítrico solo, pero mantuvieron una reducción de estas bacterias respecto al no lavado que fue suficiente para evitar la mancha bacteriana (Tabla 4).

En estos procedimientos de lavado es necesaria una manipulación muy cuidadosa del champiñón, aplicando una agitación ligera que evite los roces que deterioran el color, al mismo tiempo que favorezca la eliminación de los restos de tierra.

Es necesario valorar el beneficio real de la aplicación de estos tratamientos sobre la aceptación del champiñón laminado, ya que suponen un aumento de los costes del proceso de elaboración.

ENVASADO

El envasado del champiñón laminado, generalmente se hace en bandejas recubiertas con un film plástico para proteger el producto. El primer efecto beneficioso de este envasado es que evita la excesiva deshidratación del champiñón que puede darse sobre todo a la humedad relativa del ambiente, aunque la temperatura sea baja. Dentro del envase se alcanza una humedad relativa que depende del coeficiente de transmisión de vapor de agua del film plástico. Sería deseable un coeficiente que permitiera una humedad relativa que redujera la deshidratación pero sin llegar al punto de condensación, ya que esto puede favorecer el deterioro del champiñón (Halachmy y Mannhein, 1992).

Otro efecto del envasado con films plásticos es que dan lugar a una modificación de la atmósfera en el interior de los envases caracterizada por una reducción del O₂ y un aumento de CO₂. La concentración de estos gases depende de la actividad respiratoria del producto, la permeabilidad del film a los gases, la cantidad de producto envasado y su relación con la superficie del film, y además de la temperatura de almacenamiento. Todos estos factores hay que tenerlos en cuenta para diseñar un envase adecuado de manera que la atmósfera que se cree por lo menos no perjudique al producto.

Atmósferas con 2,5 – 5% de CO₂ y 5% de O₂ se han considerado aceptables para el champiñón (López-Briones *et al.*, 1992; Cliffe-Byrnes y O'Beirne, 2007). Niveles de O₂ del 2% o menores pueden producir anaerobiosis y favorecer el crecimiento de patógenos anaerobios por lo que no son recomendables (Beit-Halachmy y Manhein, 1992). Por otro lado, concentraciones de CO₂ por encima del 5% se han considerado fitotóxicas (López-Briones *et al.*, 1992).

Cliffe-Byrnes y O'Beirne (2007) han encontrado que una concentración de O₂ del 5% redujo la actividad respiratoria del champiñón a temperaturas entre 4 y 16 °C, siendo mayor el efecto a las temperaturas más altas. Este nivel de O₂ junto con niveles de CO₂ inferiores al 5% pueden retrasar el desarrollo del champiñón (Roy *et al.*, 1995a). No obstante ya hemos visto que este efecto sobre el desarrollo del champiñón puede conseguirse simplemente con la temperatura de refrigeración y por tanto la acción de la atmósfera modificada sería útil cuando la temperatura aumente.

En algunos trabajos se ha observado que un posible beneficio de atmósferas consideradas por lo menos no perjudiciales, sea la reducción del crecimiento de *Pseudomonas* y de la mancha bacteriana, cuando la temperatura de almacenamiento ha sido de 4 °C (Simón *et al.*, 2005).

Características de los films plásticos

Los champiñones requieren un envasado con films de alta permeabilidad debido a su elevada actividad respiratoria, para evitar el alcanzar situaciones de anoxia o de elevados niveles de CO₂.

Existen modelos matemáticos para determinar las permeabilidades óptimas para determinadas condiciones del envase (peso de producto a envasar, área del film semipermeable y su espesor, actividad respiratoria del producto y temperatura).

Además hay que tener en cuenta la relación entre las permeabilidades del CO₂ y del O₂, que en el caso del champiñón debe ser entre 2,5 y 3, para alcanzar un nivel de O₂ en torno al 5% sin que se produzca una concentración de CO₂ mayor del 5% que se ha considerado como la atmósfera óptima (Cliffe-Byrnes y O'Beirne, 2007).

También hay que considerar que la actividad respiratoria aumenta al aumentar la temperatura, de manera que si la temperatura de almacenamiento oscila por ejemplo entre 4 °C y 10 °C, se necesita que también aumente la permeabilidad del film para que se mantenga la atmósfera deseada.

Entre los films disponibles en el mercado para el envasado de productos vegetales, es difícil encontrar alguno que reúna todas las condiciones indicadas para conseguir una atmósfera óptima, sobre todo en el caso de los champiñones por su elevada actividad respiratoria.

Se ha optado, a veces, por los films perforados con un determinado número de orificios en su superficie. Estos films no protegen adecuadamente de la deshidratación, alcanzándose pérdidas de peso del orden de 4 – 5% a los siete días, a 5 °C y humedad relativa ambiente. No modifican la atmósfera, con lo cual se evita el riesgo de anaerobiosis pero no se aprovechan las ventajas de una atmósfera modificada adecuada. Si la temperatura alcanza niveles por encima de 5 °C, los champiñones se desarrollan rápidamente deformándose las láminas en el caso de los laminados y también aparece antes la mancha bacteriana (González-Fandos *et al.*, 2006). Para reducir o evitar estas alteraciones, es necesario mantener la temperatura a valores de 0-5 °C con este tipo de film.

El film de PVC no perforado de un espesor alrededor de 12 micras, ha protegido de la excesiva deshidratación y, debido a su permeabilidad relativamente elevada al vapor de agua (coeficiente de transmisión de vapor de agua = 200 g. m⁻² día⁻¹) la condensación no es excesiva. Pero la permeabilidad de este film a los gases O₂ y CO₂ no es suficientemente elevada para envases con 200 g de champiñón laminado, pudiendo alcanzar niveles de O₂ del orden del 2% o inferiores, incluso a la temperatura de 5 °C (Simón *et al.*, 2008). Además, si la temperatura aumenta, su permeabilidad no varía en el mismo sentido por lo que se pueden alcanzar atmósferas más extremas que pueden producir anaerobiosis y crecimiento de esporulados anaerobios.

Los films microperforados tipo P-Plus, pueden tener una permeabilidad a los gases más elevada que los films de PVC, pero la relación de permeabilidades de CO₂ y O₂ es de 1, con lo que para alcanzar niveles de CO₂ del orden del 5% que no perjudiquen, se alcanzan niveles de O₂ elevados (15-18%). Con estas atmósferas no hay riesgo de anaerobiosis ni de daño por efecto del CO₂, pero tampoco inhiben el crecimiento del champiñón. Además, estos films tienen un coeficiente de transmisión de vapor de agua muy bajo (0,9 g. m⁻² día⁻¹), con lo que se produce abundante condensación de agua que puede favorecer el deterioro microbiano (Simón y Gurría, 1998). Generalmente, estos films llevan un tratamiento anti-vaho con el que se disimula la condensación pero el agua condensada permanece dentro del envase favoreciendo posiblemente el crecimiento microbiano.

En el CIDA de la Rioja se ha trabajado con estos tres tipos de film, pero actualmente se está investigando y están apareciendo en el mercado otros materiales de envasado que pueden contribuir a resolver las deficiencias encontradas con los tipos de film mencionados.

Están apareciendo biopolímeros que, además de ser biodegradables, pueden tener una permeabilidad selectiva para CO₂, O₂ y humedad, además de una elevada relación de permeabilidades CO₂/O₂ que permita alcanzar un nivel suficientemente bajo de O₂ sin que la concentración de CO₂ sea excesiva (Catalá *et al.*, 2009). Según estos autores, también

hay polímeros que modifican su permeabilidad en función de los cambios de temperatura, pudiendo así mantenerse la atmósfera óptima a pesar de las fluctuaciones de temperatura que puede haber durante la distribución del producto.

También se está avanzando mucho en el desarrollo de envases activos que son los que incorporan algunos elementos con capacidad para absorber exceso de gases o humedad, o con propiedades antimicrobianas.

En el caso del champiñón fresco se ha estudiado el uso de absorbedores de humedad a base de sorbitol (Roy *et al.*, 1995b) o de una mezcla de bentonita, sorbitol y cloruro cálcico (Mahajan *et al.*, 2008) para reducir la humedad de los envases.

El diseño de un envasado óptimo para el champiñón, teniendo en cuenta los principios expuestos, podría contribuir a aumentar la vida útil del champiñón fresco manteniendo su calidad, aunque también hay que tener en cuenta el coste del mismo.

REFERENCIAS

- BEIT-HALACHMY I., MANNHEIM C.H. (1992). Is modified atmosphere packaging beneficial for fresh mushrooms?. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology* **25**: 426-432.
- BRENNAN M., GORMLEY R. (1998). Extending the shelf life of fresh sliced mushrooms. *Research Report nº 2*. Teagasc, Dublin, Irlanda.
- BRENNAN M., LE PORT G., GORMLEY R. (2000). Postharvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf-life of fresh sliced mushrooms. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology* **33**: 285-289.
- CATALÁ R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ P., LÓPEZ-CARBALLO G., GAVARA R. (2009). Materiales para el envasado de frutas y hortalizas con tratamientos mínimos. *Horticultura Internacional* **69**: 60-65.
- CLIFFE-BYRNES V., O'BEIRNE D. (2007). Effects of gas atmosphere and temperature on the respiration rates of whole and sliced mushrooms (*Agaricus bisporus*). Implications for film permeability in modified atmosphere packages. *Journal of Food Science* **72** (4): 197- 204.
- CLIFFE-BYRNES V., O'BEIRNE D. (2008). Effects of washing treatment on microbial and sensory quality of modified atmosphere (MA) packaged fresh sliced mushroom (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology* **48**: 283-294.
- GONZÁLEZ-FANDOS E., SIMÓN A., TOBAR V. (2006). Quality and shelf-life of packaged fresh sliced mushrooms stored at two different temperatures. *Agricultural and Food Science* **15**: 414-422.
- LÓPEZ-BRIONES G., VAROQUAUX P., CHAMBROY Y., BOUQUANT J., BUREAU G., PASCAT B. (1992). Storage of common mushroom under controlled atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology* **27**: 493-505.
- MAHAJAN P.V., RODRIGUES F.A.S., MOTEL A., LEONHARD A. (2008). Development of a moisture absorber for packaging of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology* **48**: 408-414.

Real Decreto 3484 (2000). Normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Boletín Oficial del Estado: 1431-1441.

ROY S., ANANTHESWARAN R.C., BEELMAN R.B. (1995a). Fresh mushroom quality as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science* **60**: 334-340.

ROY S., ANANTHESWARAN R.C., BEELMAN R.B. (1995b). Sorbitol increases shelf life of fresh mushrooms stored in conventional packages. *Journal of Food Science* **60**: 1254-1259.

SAPERS G.M., MILLER R.L., MILLER F.C., COOKE P.H., CHOI S.W. (1994). Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. *Journal of Food Science* **59** (5): 1042-1047.

SAPERS G.M., MILLER R.L., PILIZOTA V., KAMP F. (2001). Shelf-life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. *Journal of Food Science* **66** (2): 362-366.

SIMÓN A., GURRÍA A. (1998). Empaquetado de champiñón (*Agaricus bisporus*) con cuatro tipos de film plástico. *Alimentaria* **293**: 57-62.

SIMÓN A., GONZÁLEZ-FANDOS E., TOBAR V. (2005). The sensory and microbiological quality of fresh sliced mushrooms (*Agaricus bisporus* l.) packaged in modified atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology* **40**: 943-952.

SIMÓN A., GONZÁLEZ-FANDOS E., VÁZQUEZ M. (2008). Efecto del lavado y de la atmósfera modificada sobre la calidad sensorial y microbiana del champiñón laminado. En: *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. Pp. 692-699.

SIMÓN A., GONZÁLEZ-FANDOS E. (2009a). Effect of washing with citric acid or sodium hypochlorite on the visual and microbiological quality of mushrooms (*Agaricus bisporus* L.). *Journal Food Quality*. (Aceptado para su publicación. En prensa)

SIMÓN A., GONZÁLEZ-FANDOS E. (2009b). Effect of washing with citric acid and antioxidants on the colour and microbiological quality of whole mushrooms (*Agaricus bisporus* L.) *International Journal of Food Science and Technology*. (Aceptado para su publicación. En prensa)



Fotografía 1. Champiñón laminado, envasado con film perforado y mantenido a 5 °C y 9 °C durante cinco días.

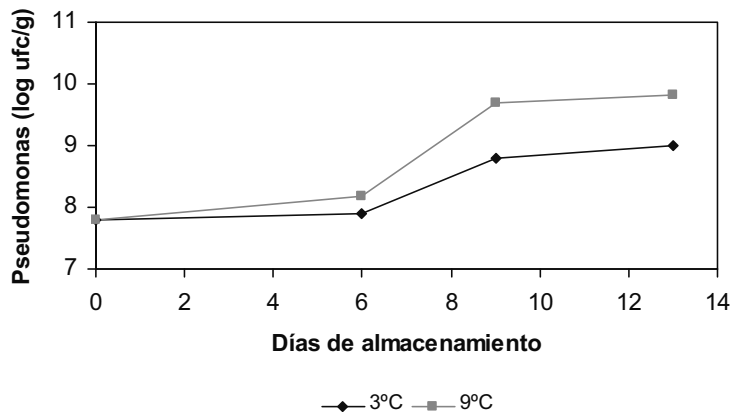


Figura 1. Recuento de *Pseudomonas* en champiñones laminados envasados con film de PVC perforado y almacenados a 3 °C y 9 °C durante 13 días.

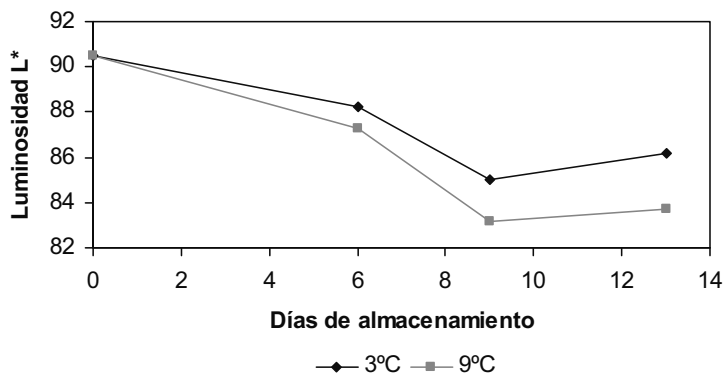


Figura 2. Oscurecimiento (disminución de L*) de las láminas de champiñón laminado, envasado con film de PVC perforado y almacenado a 3 °C y 9 °C durante 13 días.

Tabla 1. Recuentos de *Pseudomonas* (log cfu/g) en champiñones no lavados, lavados con agua y lavados con ácido cítrico 10 g/l, almacenados a 3 °C durante 13 días.

	Días de almacenamiento	Tratamiento de lavado		
		No lavado	Agua	Acido cítrico
Experimento 1	0	7,07	6,73	4,63
	8	8,85	8,81	6,59
	13	9,15	9,11	7,69
Experimento 2	0	6,63	6,04	5,00
	8	8,11	6,77	6,07
	13	8,34	8,58	6,15

DMS_{0,05} : Experimento 1 = 0,308; Experimento 2 = 0,371

Tabla 2. Incidencia de mancha bacteriana¹ en champiñones no lavados, lavados con agua y lavados con ácido cítrico 10 g/l, almacenados a 3 °C durante 13 días.

	Días de almacenamiento	Tratamiento de lavado		
		No lavado	Agua	Acido cítrico
Experimento 1	8	1,5	3	1
	13	4,0	5	1
Experimento 2	8	1	1,5	1
	13	2,5	3,5	1

¹ Escala: 1: nada; 2: ligera; 3: moderada; 4: severa; 5: extrema

Tabla 3. Análisis sensorial de la apariencia de champiñón laminado, sin lavar y lavado con ácido cítrico 1%, envasado con film de PVC perforado y mantenido a 5 °C durante 13 días.

Días	Tratamientos	
	Sin lavar	Lavados
1	8,0	6,1
8	6,6	6,9
13	4,4	6,2

Escala: 9: me gusta muchísimo; 7: me gusta bastante; 5: ni me gusta ni me disgusta; 3: me disgusta bastante; 1: me disgusta muchísimo. DMS_{0,05} = 0,77 (Simón *et al.*, 2008)

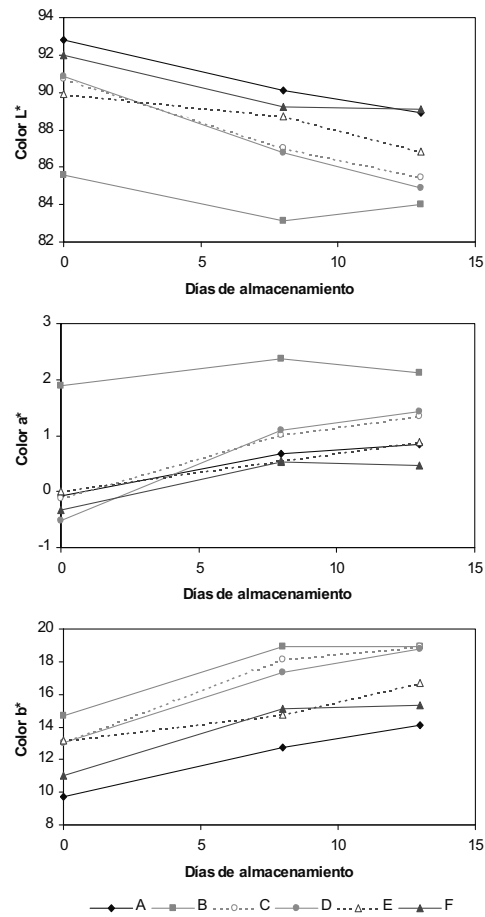


Figura 3. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) en champiñones enteros sometidos a los siguientes tratamientos de lavado: A: sin lavar; B: cítrico-agua; C: cítrico- D-isoascorbato de sodio 1%; D: cítrico- D-isoascorbato de sodio 1,5%; E: cítrico- L-ascorbato sódico 1%; F: cítrico- L-ascorbato sódico 1,5%, almacenados a 5 °C durante 14 días.

Tabla 4. Recuento de *Pseudomonas* (log ufc/g) en champiñones almacenados a 5 °C durante 13 días, para los siguientes tratamientos de lavado (A: sin lavar, B: cítrico-agua; C: cítrico-isoascorbato 1%, D: cítrico-isoascorbato 1,5%, E: cítrico- ascorbato 1%, F: cítrico- ascorbato 1,5%).

Días de almacenamiento	Tratamiento de lavado					
	A	B	C	D	E	F
0	6,58	3,76	4,75	3,63	3,93	4,14
8	7,44	4,58	5,69	5,40	5,89	5,64
13	7,97	6,19	6,72	6,55	6,55	6,59

DMS_{0,05} = 0,32

Guía de implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados

Jesús Ángel Peñaranda Núñez¹, José Emilio Pardo González² y Arturo Pardo Giménez³

¹Cooperativas Agro-Alimentarias Castilla-La Mancha (UCAMAN), Paseo de la Libertad, 15. 02001 Albacete, España.

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, s/n. 02071 Albacete, España.

³Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), C/ Peñicas, s/n. Apartado 63, 16220 Quintanar del Rey, Cuenca, España.

INTRODUCCIÓN

La libre circulación de productos alimentarios es una condición previa fundamental para la realización del mercado único. Este principio presupone la confianza en el nivel de seguridad de los alimentos destinados al consumo humano y, en particular, su nivel de higiene en todas las fases de preparación, transformación, fabricación, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, manipulación y venta o suministro al consumidor (Pardo, 1998). La garantía sanitaria de los alimentos se ha convertido, por tanto, en una exigencia innegociable por parte de los consumidores e irrenunciable por parte de la industria alimentaria, en definitiva, la garantía sanitaria ya no es un factor de calidad, sino simplemente una condición previa.

La Directiva General de Higiene de los Alimentos 43/93/CEE (transpuesta al ordenamiento jurídico español a través del Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre), establece que las empresas del sector alimentario, deben poner en marcha un sistema de autocontrol de sus producciones, basado en el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) (DOCE, 1993). El APPCC, definido como un sistema preventivo de control de los alimentos cuyo objetivo principal es la seguridad o inocuidad alimentaria, (ICMSF, 1991; Moreno, 1996)), introduce como primera novedad, no el concepto de prevención, ya asumido por los distintos sectores, sino el hecho que la responsabilidad de la seguridad del consumidor se traslada desde la inspección oficial (realizada por las administraciones públicas), hasta el ámbito del productor, que debe garantizar esa seguridad con la prevención (NOVOTEC, 1999).

El sistema de APPCC puede aplicarse a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la adquisición de las materias primas, hasta la producción, distribución, venta y consumo del producto. Además de mejorar la inocuidad de los alimentos, su aplicación puede ofrecer otras ventajas significativas, tales como facilitar la inspección por parte de las autoridades de reglamentación y promover el comercio internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos.

Este sistema fue presentado, por primera vez, en USA, durante la Nacional Conference of Food Protection, en 1971 (APHA, 1972). En España, el sistema ha sido ya implantado, con éxito, en algunos sectores agroalimentarios, caso de cárnicas, lácteas, bodegas, envasadoras de aceite y comedores colectivos, y se prevé implantarlo, a corto plazo, en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados, de ahí la escasa información disponible al respecto, y el interés de la presentación de esta guía (Peñaranda *et al.* 2009).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se considera como objetivo principal, la preparación de una Guía para la implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico en la línea de producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados, en cualquier instalación e industria de Castilla-La Mancha que trabaje en este sector, ayudando así a que las diferentes industrias de este sector puedan llevar a cabo un autocontrol de sus producciones basado en el sistema de APPCC.

Mediante la aplicación del sistema APPCC se pretenden identificar y evaluar los peligros vinculados a las diversas líneas, y fases dentro de cada línea, del sector del champiñón y otros hongos comestibles cultivados, determinando en qué operaciones resultarán eficaces los procedimientos de control.

Además, la implantación del sistema APPCC en este tipo de industrias, pretende conseguir otro objetivo, que aun no siendo el prioritario también es de gran importancia, y sería el conseguir mejorar la calidad de sus productos, para aumentar la satisfacción y seguridad del consumidor, mejorando la imagen de las empresas y potenciando su competitividad, facilitándose, a su vez, la posibilidad de conseguir nuevos mercados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se han visitado distintas instalaciones, tanto de la producción como de la transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados de la Comunidad de Castilla-La Mancha.

Como paso previo a la implantación del sistema APPCC, es necesario implantar una serie de planes de actuación englobados bajo el nombre de Requisitos Previos o Prerrequisitos:

- Plan de control de aguas
- Plan de limpieza y desinfección
- Plan de formación y control de manipuladores
- Plan de mantenimiento
- Plan de control de desinsectación y desratización
- Plan de control de proveedores
- Plan de control de la trazabilidad

- Plan de control de desperdicios

Es por ello, que en esta guía se han incorporado todos los planes de Requisitos Previos, y además se han complementado con multitud de figuras, para que a modo de ejemplo muestren una parte importante de la documentación que forma parte de cada uno de ellos.

Para cada una de las líneas de trabajo (preparación del micelio, elaboración de compost, ciclo de cultivo de hongos comestibles, transformación de hongos comestibles para consumo en fresco y conserva de hongos comestibles) se han desarrollado las siguientes etapas:

- Elaboración del diagrama de flujo, desde la recepción de materias primas hasta la expedición del producto terminado.
- Identificación de los riesgos potenciales o peligros asociados a los procesos productivos en cada una de sus etapas, siguiendo el sinóptico de aplicación del sistema APPCC.
- Determinación de los puntos, procedimientos o etapas operacionales que puedan ser controladas, para eliminar los peligros o minimizar la probabilidad de su presentación (Puntos de Control Crítico, PCCs).
- Fijación de los límites críticos que deben cumplirse para asegurar que cada PCC está bajo control.
- Establecimiento de un sistema de vigilancia que permita asegurar el control de los PCCs, mediante pruebas u observaciones programadas.
- Establecimiento de las acciones correctoras que se pondrán en funcionamiento cuando la vigilancia de un determinado PCC indique que no está controlado.
- Establecimiento de un sistema de registro, en el que se anotarán los procedimientos y datos relativos a los principios anteriores.
- Fijación de las normas generales de prácticas higiénicas, tanto de personal como de instalaciones y equipos.

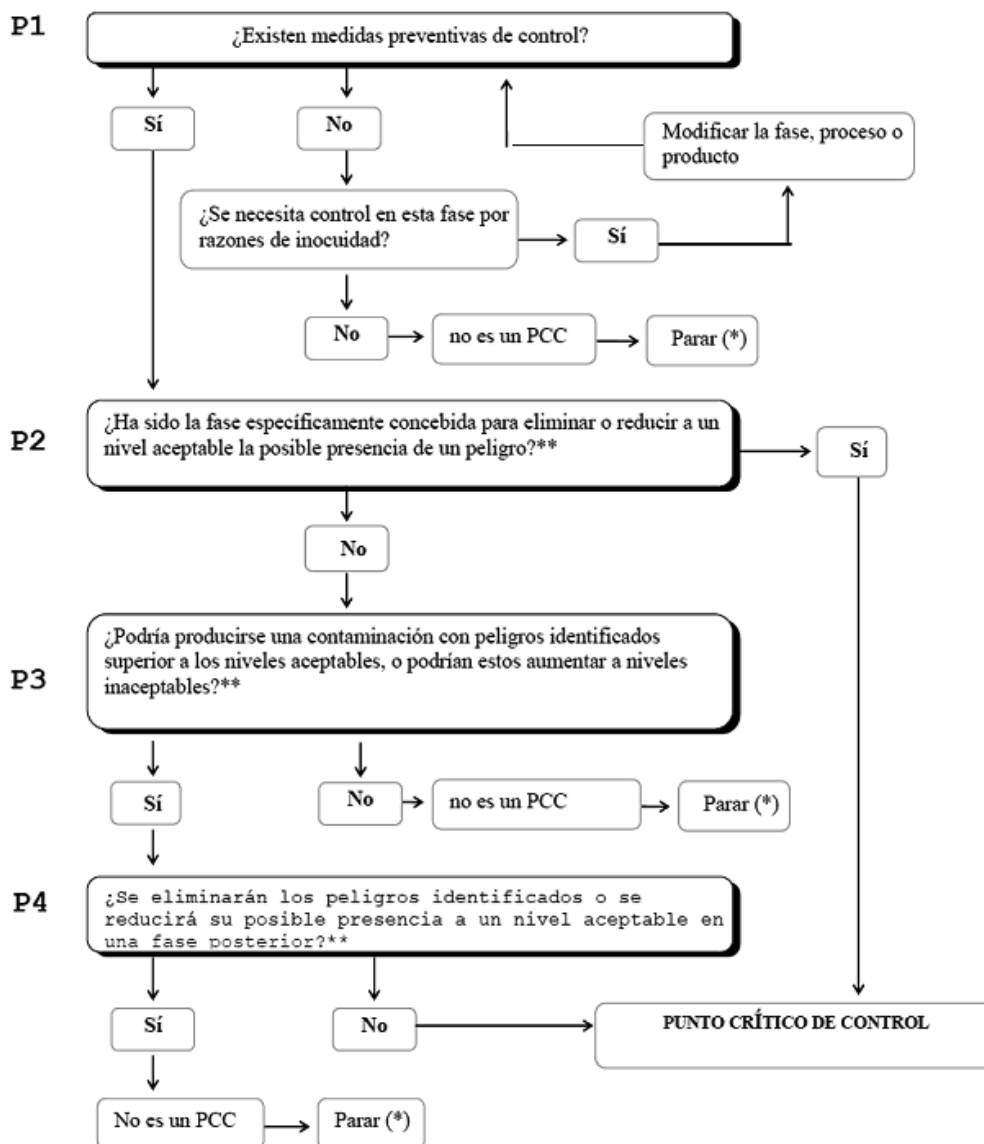
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este trabajo, se ha conseguido elaborar una guía de implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados, en las industrias de Castilla-La Mancha, en las líneas que componen este sector (Peñaranda *et al.* 2009):

- Línea de preparación del micelio.
- Línea de Elaboración de compost.
- Línea de ciclo de cultivo de hongos cultivados.
- Línea de transformación de hongos comestibles para consumo en fresco.
- Línea de elaboración de conserva de hongos comestibles.

Contribuyendo al mismo tiempo al cumplimiento de la legislación vigente, ya que es un requisito que puede ser exigido en cualquier momento por la Administración competente, y que ya está implantado en muchas empresas agroalimentarias.

Ejemplo del árbol de decisión utilizado para determinar los PCCs (FAO, 2003).



Los principales peligros encontrados en el conjunto de las líneas se tipifican en físicos, químicos y biológicos.

Dentro de los **peligros físicos** destacar los siguientes (Peñaranda *et al.* 2009):

- Presencia de cuerpos extraños y suciedad (insectos, polvo,...)
- Daños mecánicos
- Daños por congelación

- Pudrición por condensaciones
- Malas condiciones higiénico-sanitarias de instalaciones, equipamiento y herramientas de trabajo
- Recepción de materiales no estériles, contaminados con materiales extraños, productos químicos o microorganismos
- Deterioro o rotura por almacenamiento inadecuado
- Fallo en el funcionamiento de aparatos o equipos
- Material auxiliar con daños físicos
- Desecación y pérdida de brillo del champiñón
- Contaminación con trazas metálicas procedentes de las cuchillas
- Mala realización del corte
- Lavado inadecuado
- Pardeamiento del producto
- Relación tiempo/temperatura incorrecta
- Oxidación de los envases

Dentro de los **peligros químicos** destacar los siguientes (Peñaranda *et al.* 2009):

- Deficiente calidad
- Presencia de residuos fitosanitarios
- Pudrición por condensaciones
- Oxidación por altas temperaturas
- Mala circulación del aire de refrigeración
- Uso de agua contaminada
- Malas condiciones higiénico-sanitarias de instalaciones, equipamiento y herramientas de trabajo
- Inadecuado aislamiento del laboratorio
- Recepción de materiales no estériles, contaminados con materiales extraños, productos químicos o microorganismos
- Contaminación química
- Falta de limpieza y desinfección de la máquina lavadora
- Contaminación microbiológica o química procedente de los suplementos añadidos
- Envases contaminados
- Presencia de residuos fitosanitarios
- Posible contenido en metales pesados
- Contaminación por residuos químicos de la limpieza de equipos e instalaciones
- Alteración de los materiales auxiliares utilizados
- Contaminación del compost por residuos químicos de los tratamientos de desinfección de la tierra de cobertura
- Envases no aptos para uso alimentario
- Desecación y pérdida de brillo del champiñón
- Formulación incorrecta del líquido de gobierno
- Temperatura inadecuada del líquido de gobierno

- Oxidación de los envases

Dentro de los **peligros biológicos** destacar los siguientes (Peñaranda *et al.* 2009):

- Presencia de bacterias patógenas, levaduras, mohos o enterotoxinas termoestables
- Malas condiciones higiénico-sanitarias de instalaciones, equipamiento y herramientas de trabajo
 - Falta de higiene de los manipuladores
 - Oxidación por altas temperaturas
 - Mala circulación del aire de refrigeración
 - Alteración microbiana
 - Uso de agua contaminada
 - Elección de champiñones contaminados
 - Falta de higiene de los manipuladores
 - Falta de formación del personal
 - Inadecuado funcionamiento de equipos de asepsia
 - Inadecuado aislamiento del laboratorio
 - Contaminación microbiana procedente de otros cultivos
 - Envases con daños físicos
 - Recepción de materiales no estériles, contaminados con materiales extraños, productos químicos o microorganismos
 - Suciedad (insectos, polvo...)
 - Falta de limpieza y desinfección de la máquina lavadora
 - Multiplicación de los microorganismos presentes
 - Contaminación microbiológica o química procedente de los suplementos añadidos
 - Envases contaminados
 - Producto mal esterilizado (supervivencia de bacterias termófilas)
 - Excesiva carga microbiana en el ambiente del laboratorio
 - Contaminación cruzada
 - Elevada temperatura de almacenamiento
 - Mala circulación del aire de refrigeración
 - Alteración microbiana por temperaturas inadecuadas de transporte
 - Presencia de parásitos patológicos
 - Multiplicación de microorganismos presentes
 - Presencia de productos fitosanitarios
 - Entrada de materias primas prohibidas para el proceso
 - Inadecuada estructura y elevado pH de la mezcla
 - Contaminación en Fase II por contacto con el compost proveniente de la Fase I
 - Falta de uniformidad del compost en el interior del túnel de pasteurización y acondicionamiento
 - Contaminación procedente del exterior
 - Alteración de los materiales auxiliares
 - Aparición de plagas y enfermedades

- Contaminación de floradas posteriores
- Material auxiliar con daños físicos
- Envases no aptos para uso alimentarios
- Cortes demasiado gruesos que afectan a la penetración del calor en el tratamiento térmico
- Producto mal esterilizado
- Oxidación de los envases

Para el control de estos peligros se proponen medidas preventivas y medidas correctoras:

Como principales **medidas preventivas** se proponen las siguientes (Peñaranda *et al.* 2009):

- Homologación de proveedores y cultivadores
- Seguir pautas de cultivo y recolección
- Transporte exclusivo de champiñón, rápido, cuidadoso y en vehículos limpios. En expedición debe ser además refrigerado
- Prohibir fitosanitarios no autorizados
- Análisis visual de cada partida
- Aplicación del plan L+D
- Aplicación de buenas prácticas de higiene y manipulación
- Mantenimiento preventivo de todos los equipos existentes
- Control de la temperatura (T), humedad relativa (HR), oxígeno, CO₂, caudal de aire, presión y tiempo dependiendo de la etapa en la que nos encontremos
- Colocación correcta de la cajas
- Asegurar potabilidad del agua
- Esterilización de las herramientas y utensilios
- Instalación de equipos de aire filtrado en la extracción de tejidos
- Retirada de champiñones contaminados
- Restricción de paso a personal ajeno y minimizar el tránsito en el interior
- Requisito de formación del personal
- Correcto aislamiento
- Revisión diaria de los cultivos
- Almacenamiento y manejo correctos
- Control de la esterilización y del tiempo/temperatura
- Uso de equipos de asepsia
- Rotación de stocks
- Análisis microbiológico y químico
- Utilización de materias primas autorizadas para el proceso
- Evitar materias primas precedentes de residuos urbanos
- Supervisión del proceso de mezclado y realización de análisis
- Adición de mejorantes de la estructura y pH
- Compostaje en área cementada y cubierta (Fase I)

- Compostaje en túneles totalmente aislados (Fase II)
- Nivelación adecuada del compost en el interior del túnel
- Evitar contaminaciones cruzadas
- Desmenuzar el bloque de semilla un día antes de la siembra
- Instalación de sistema de sobrepresión de aire filtrado en expedición de compost.
- Prohibir el transporte de compost al cultivo en vehículos dedicados al transporte de compost usado
- Evitar que coincida el llenado de la nave con el vaciado de otra a menos de 150 m
- Instalación de trampas para mosquitos
- Desinfección de la tierra de cobertura
- Finalizar la producción a partir de la tercera florada y desalojo inmediato
- Antes del vaciado de naves, tratar con vapor
- Cubrir con lonas el sustrato post-cultivo en el transporte
- Adición de ácido cítrico al agua de escaldado
- Temperatura del líquido de gobierno de 90 °C

Y como principales **medidas correctoras** se proponen estas (Peñaranda *et al.* 2009):

- Rechazo o desvío de partidas no aptas
- Cambio de proveedores
- Corregir planes L+D y de buenas prácticas de higiene y manipulación
- Incidir en directrices de cultivo y transporte
- Puesta a punto del funcionamiento de cámaras y equipos
- Retirar inmediatamente productos contaminados
- Lavar paredes, suelo y techo de cámaras
- Saneamiento del agua o cambio de punto de abastecimiento
- Volver a esterilizar herramientas y utensilios
- Corregir el programa de mantenimiento de los equipos
- Corregir valores de temperatura y humedad
- Obras y restauración para corregir deficiencias de aislamiento
- Corregir colocación de los stocks
- Corregir errores en recomendaciones de siembra
- Detener inicio de llenado hasta finalizar el vaciado de una nave cercana
- Cambio de trampas antimosquitos
- Cambio de programación o producto fitosanitario
- Repetir desinfección de la tierra
- Corregir T del líquido de gobierno y/o ajustar la proporción de mezclado

Para poder realizar correctamente todo este control se utilizarán registros en los que recoger toda la información necesaria. A modo de ejemplo podemos citar los registros de listado de proveedores y especificaciones, entradas y salidas de partidas, resultados de inspecciones visuales y controles, lotes rechazados, programa de L+D, análisis de agua, programa de buenas prácticas de manipulación y transporte, incidencias y medidas

correctoras, control de parámetros de interés (T, HR, oxígeno, CO₂, etc.), programa de mantenimiento preventivo de equipos, etc.

Gracias a este sistema, cuya implantación requerirá un periodo de tiempo de adaptación, se conseguirán unos beneficios a corto y medio plazo, como son:

- Obtención de productos de mayor calidad.
- Disminución de productos defectuosos en el mercado, con lo que se mejorará la imagen de calidad de la empresa.
- Disminución de gastos en analíticas finales.
- Facilidad y rapidez en la detección de fallos, gracias a la documentación y registro de todas las operaciones.
- Mayor integración de los trabajadores y consecución de hábitos de trabajo favorables para la implantación de nuevos sistemas de calidad en la empresa.
- Aumento de la competitividad de la empresa, tanto en mercados nacionales como extranjeros, con el consiguiente aumento de las ventas.

Para una mejor comprensión de los procesos, en la guía publicada por el Patronato de Desarrollo Provincial de la Diputación Provincial de Cuenca se ha incluido un reportaje fotográfico (Peñaranda *et al.* 2009).

REFERENCIAS

APHA (American Public Health Association). (1972). *Proceedings of the 1971 National Conference on Food Protection*. Ed. Food and Drug Administration, New York.

DOCE (1993). *Directiva 93/43/CEE relativa a la higiene de los productos alimenticios*. Diario Oficial CEE, nº 175, de 19 de julio de 1993.

ICMSF (1991). *El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

MORENO, B. (1996). El autocontrol y el sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos en las industrias de alimentos: los plazos para su implantación finalizan. *Alimentaria* **273**: 27

NOVOTEC (1999). *Guía de aplicación del Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARCPC) en almazaras*. Ed. Caja Rural de Jaén. Jaén.

PARDO, J.E. (1998). *La Industria Cárnica: El sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos*. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-Mancha. Cuenca.

PEÑARANDA, J.A., PARDO, J.E., PARDO, A. (2009). Guía de implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en la producción, transformación y comercialización del champiñón y otros hongos comestibles cultivados. Patronato de Desarrollo Provincial. Diputación Provincial de Cuenca. 522 pp.

Características generales, producción y comercialización de *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann (*A. brasiliensis*): Una nueva alternativa de cultivo de hongo en España

Diego Cunha Zied¹, José Emilio Pardo González², Arturo Pardo Giménez³ y Marli Teixeira de Almeida Minhoni¹

¹Módulo de Cogumelos, Departamento de Producción Vegetal (Defesa Fitossanitária), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, FCA/UNESP. Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, s/n. 02071 Albacete, España.

³Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), C/ Peñicas, s/n, Apartado 63. 16220 Quintanar del Rey, Cuenca, España.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cultivo de *Agaricus blazei* (Murril) está despertando gran interés en la comunidad científica debido, principalmente, a sus propiedades medicinales y farmacológicas, destacando el alto contenido en β -glucano y en lentinan. En Brasil, a *A. blazei* se le conoce popularmente como "Seta Medicinal" o "Seta de Piedade", en los Estados Unidos como "Royal Sun Agaricus" y en Japón como "Himematsutake".

Según la bibliografía consultada, la primera aparición conocida de este basidiomiceto tuvo lugar en el pueblo de Tapiraí (São Paulo, Brasil), a mediados de la década de 1960, cuando éste todavía pertenecía a la provincia de Piedade (São Paulo, Brasil). Un agrónomo, llamado Takatoshi Furumoto, que trabajaba, estudiaba y producía hongos (*Lentinula edodes* y *Agaricus bisporus*), lo recogió cerca de su propiedad, en la región montañosa de Mata Atlántica, también en el estado de São Paulo. El Sr. Furumoto clonó y comenzó a hacer algunas pruebas de producción con este hongo, iniciándose su cultivo en Brasil en 1980.

Algunas muestras fueron enviadas a Japón para estudiar sus propiedades medicinales, pues en aquel tiempo ya se observaban sus positivas respuestas tras el consumo del té. Estudios sobre su taxonomía, su morfología y sus propiedades medicinales y agronómicas comenzaron a realizarse por parte de la comunidad científica mundial.

En 1985, tras la muerte del Sr. Furumoto, el cultivo de *A. blazei* en Brasil quedó en el olvido, pero a mediados de la década de los 90', matrices mejoradas genéticamente (trabajo del Iwade Institute) fueron enviados de nuevo a Brasil, pues disponía de mejores condiciones climáticas. Desde entonces, los cultivos comerciales se llevan a cabo de forma familiar y, a veces, industrial. Se cree que países asiáticos como China, Corea y Taiwán, y los Estados Unidos, también recibieron algunas de estas muestras para su cultivo, produciendo *A. blazei* de forma comercial.

En definitiva, el cultivo de *A. blazei* es reciente, por lo que se dispone de pocos conocimientos sobre su tecnología de producción, habiéndose desarrollado en los distintos lugares, adaptaciones de la tecnología utilizada en la producción de *A. bisporus* (champiñón).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El esporóforo de *A. blazei* tiene, por término medio, un sombrero de 5 a 11 cm de diámetro, es semigloboso tras su apertura y truncado en la parte superior, de color marrón claro a crema, con pequeñas escamas blancas en la parte superior que sobresalen del sombrero (2-3 mm). El pie se estrecha en su unión con el sombrero, tiene de 4-13 cm de largo y de 1 a 3 cm de diámetro, con un espesor uniforme o una base bulbosa de color blanco (Figura 1).

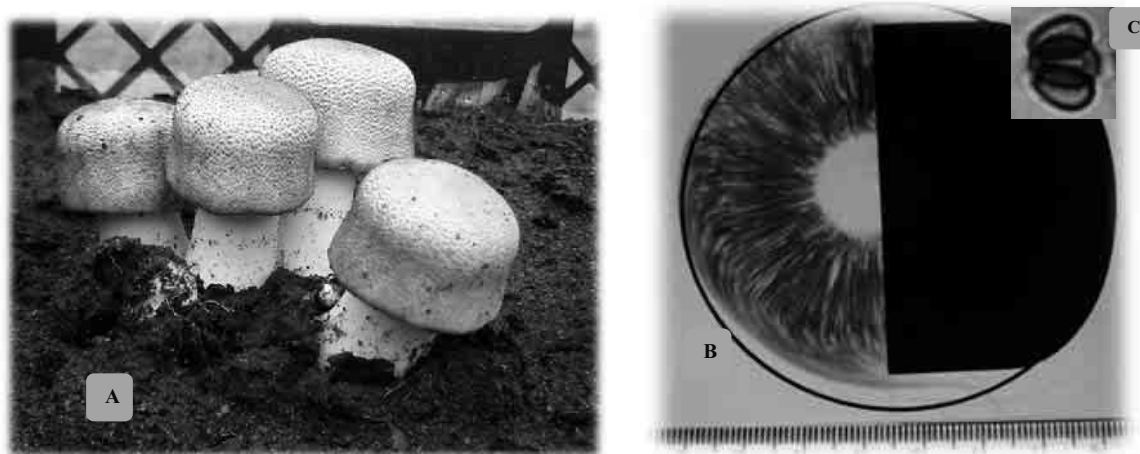


Figura 1. A: Aspectos morfológicos del hongo, B: Esporas del hongo en la senescencia y C: Espora con forma globosa.

Las láminas se disponen muy cerca unas de otras, sin conectarse en el tallo, con 0,8-1,0 cm de ancho y de color blanco a gris marrón (marrón oscuro en la senescencia). Las esporas son elípticas (4,9 a 6,4 por 4,0 a 4,7 μm), de color marrón oscuro, con paredes gruesas, sin poros; basidios del tipo tetraspórico y cystídios claviformes o con forma de lanza (18 a 27 por 6 a 10 μm) o catenulares con elementos globosos (5 a 7 μm de diámetro), hialino o de color marrón (Heinemann, 1993).

En cuanto a su nomenclatura hay mucha controversia, encontrándose citas en la literatura en la que se le nombra como *A. sylvaticus*, *A. brasiliensis*, *A. subrufescens*, entre otros (Fortes et al., 2006; Camelini et al., 2005; Kerrigan, 2005). Por ello, desde principios de 2008, en un proyecto liderado por Philippe Callac y Richard W. Kerrigan, se está estudiando la biodiversidad de la especie, a fin de comparar las distintas variedades desde un punto de vista molecular.

PRODUCCIÓN DE INÓCULO, SEMILLA O “SPAWN”

La producción de inóculo se desarrolla siguiendo los pasos de Zied (2008): Producción primaria → Producción secundaria → Producción terciaria → Producción de semilla.

Para la producción de la matriz primaria se utiliza un medio de cultivo, obtenido a partir de 60 g de compost y 1 litro de agua destilada al que se añaden 15 g de agar. Con este medio de cultivo, la solución se transfiere a las placas Petri, donde la matriz primaria es inoculada con un fragmento interno de la seta seleccionada según sus características físicas y agronómicas. Después de la inoculación, las placas son incubadas a 28°C durante ocho días. Posteriormente, tras el desarrollo del micelio, discos de la matriz primaria son transferidos a la matriz secundaria, incubándose a 28°C durante otros ocho días, utilizándose el mismo medio de cultivo que en la matriz primaria.

La producción de la matriz terciaria y de la semilla se desarrolla sobre granos de cereales (trigo, avena o triticale). Para producir el sustrato se hierven los granos durante 40 minutos, adicionándose posteriormente 20 g de carbonato cálcico y 160 g de yeso (secado lento) por kilogramo de grano cocido. Este sustrato es transferido a frascos de vidrio, autoclavándose durante 2-4 horas (dependiendo del tamaño del frasco) a 121°C.

Para la inoculación de la matriz terciaria en los frascos, la matriz secundaria se divide, previamente, en ocho partes iguales de forma triangular (tipo pizza); cada una de las partes es transferida a la parte inferior del frasco vacío, colocándose el sustrato (granos) sobre la matriz secundaria, e incubando a 28°C durante 12 días.

Por último, el sustrato utilizado para la producción de la semilla es el mismo que el utilizado en la producción de la matriz terciaria; la única diferencia es que los granos (± 1 kg) se introducen en bolsas de plástico (PEAD o PP). De esta manera, se inoculan porciones de la matriz terciaria colonizada (± 6 g) en el sustrato autoclavado (a 121°C durante 2-4 horas). Posteriormente, las bolsas de plástico son selladas e incubadas durante 18 días a 28°C.

Actualmente no hay normas relativas a las abreviaturas o nombres de las cepas (variedad) utilizadas por los laboratorios de semillas. Así, cada laboratorio hace la clonación del hongo que desea, dándole el nombre que considera más adecuado para su posterior identificación. En Brasil todavía no se ha realizado ninguna mejora genética de la variedad; lo que se hace es un proceso de adaptación de las cepas, de acuerdo con las condiciones específicas de cada región o el tipo de instalación (rústica o tecnificada).

En el Módulo de Cogumelos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), existe una gran colección de cepas ya caracterizadas desde el punto de vista agronómico. La tabla 1 muestra los resultados de productividad obtenida por cinco cepas inoculadas en 3 tipos de compost (a base de caña de azúcar triturada con Massai, Avena y Aruana - ver los nombres científicos en el epígrafe relativo al Compost).

Tabla 1. Datos de productividad (kg de hongos/12kg de compost), obtenidos por 5 variedades de *A. blazei* en 3 compost diferentes.

Productividad (kg)	Variedades de <i>A. blazei</i>				
	ABL 99/28	ABL99/30	ABL 03/44	ABL 04/49	ABL 07/59
Massai	1,31 A ab	1,86 A a	1,56 A a	1,29 A ab	0,32 A c
Avena	0,93 A b	2,43 A a	1,19 A b	1,14 A b	0,35 A c
Aruana	0,66 B b	1,49 B a	1,14 A a	1,23 A a	0,20 A bc

*Letras mayúsculas comparan los resultados de una misma columna y letras minúsculas los resultados de una misma línea; las letras distintas difieren entre sí por la prueba de Tukey (5%).

En esta tabla se observa el elevado potencial productivo de la cepa ABL 99/30; en contra tiene el pequeño tamaño de los hongos recolectados y la necesidad de una temperatura de fructificación baja ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), muy por debajo de las otras cepas ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Las variedades ABL 03/44 y 04/49, tienen un rendimiento ligeramente inferior a la ABL 99/30, pero los hongos son más grandes, por lo que se venden a mayor precio, debido a las normas de comercialización del champiñón en Brasil. La cepa ABL 07/59 tiene baja productividad y alta susceptibilidad al ataque de *Verticilium* y *Mycogone*, aunque es más precoz (60 días de cultivo).

También se observan diferencias de productividad al comparar los distintos sustratos. Por ejemplo, las mayores valores se encuentran en los composts de Massai (en el caso de las cepas ABL 99/28, 03/44 y 04/49), y Avena (con las cepas ABL 99/30 y 07/59), pues sus características físicas y morfológicas (pilosidad, cantidad de ceras, etc.), influyen, al final del proceso de compostaje, en el grado de descomposición (que establece la cantidad de macro y micronutrientes que se proporcionará a los hongos) y en el número de microorganismos termófilos y Actinobacterias.

COMPOST (FASES I y II)

La producción del compost para *A. blazei* no está todavía normalizada, pero presenta diferencias con respecto al proceso de compostaje utilizado en la producción de *A. bisporus*, sobre todo en cuanto a la formulación inicial del compost.

Las formulaciones del compost clásico, a base de estiércol de caballo y de gallinaza, o de los composts sin estiércoles, cuya fuente de nitrógeno es más estable, también son utilizadas en el cultivo de este hongo. Actualmente, cerca de 60% de los cultivadores brasileños han cambiado el compost clásico por el compost sin estiércol, debido a la escasez y los elevados precios del mismo, la variación en su composición y la cantidad de contaminantes físicos que acompañan normalmente a estos materiales (bolsa de plástico, papel, piedras, etc.).

Los materiales más utilizados para la formulación del compost son:

- Bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).
- Gramíneas: Braquearía sp, Tifton (*Cynodon de lactylon* var. Tifton), Massai (*Panicum maximum* cv. Massai), Coast cross (*Cynodon de lactylon*), Aruana (*Panicum maximum*), etc.
- Pajas de cereales: Trigo, avena (*Avena sativa*) y arroz.
- Harinas: Soja, trigo, maíz, algodón, etc.
- Compuestos sintéticos: Urea, sulfato de amonio y superfosfato simple.
- Correctores de acidez: Carbonato cálcico, cal calcítica y yeso.

La Tabla 2 muestra la formulación de varios compost utilizados en la producción de *A. blazei*. La relación C/N de los compost, en el inicio de la Fase I, es de 37/1 (Kopytowski-Filho, 2002), mientras que en el momento de la inoculación bajará hasta 25-27/1. La relación nitrógeno inorgánico/orgánico es de 0,4-0,6 y la cantidad de nitrógeno puede variar entre 1,15-1,45%.

La fase I del compostaje se realiza en instalaciones con los laterales abiertos, piso de cemento (aireado o no) y techo de plástico o de uralita, la mayoría de las veces. El proceso de producción del compost sigue el método tradicional, también denominado “caixote” (cordones o pilas), en el cual los montones del compost tienen unas dimensiones de 2 m de largo por 2 m de alto, variando la longitud según la cantidad final deseada por cada cultivador. Dentro del proceso de compostaje (Fase I), se realiza el pre-humedecimiento de las pajas o gramíneas junto con el bagazo de caña, siguiendo el sistema tradicional.

La frecuencia de los volteos, manual o semi-mecanizada (Figura 2) se determina de acuerdo a los siguientes factores: Humedad del compost, materia prima utilizada (estructura física) y tipo de piso del patio de compostaje (aireado o no), entre otros. Para la elección del momento del llenado del túnel de compostaje se utilizan indicadores como la temperatura y el grado de degradación del compost y el número de actinobacterias y microorganismos termófilos, teniendo en cuenta que la pasteurización se lleva a cabo por su propia termogénesis y se trata de un sustrato más pobre que los utilizados en la producción del champiñón.

La Tabla 3 describe el proceso de compostaje realizado en un cultivo comercial, desde el montaje de los cordones hasta la inoculación del compost (final de la Fase II). Este esquema no debe seguirse obligatoriamente, pero es útil, desde un punto de vista didáctico, para la comprensión del proceso.

La Fase II del compostaje consiste en una pasteurización a $58 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10-24 horas, una aireación de $180 \text{ a } 240 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (porcentaje de aire nuevo reciclado de 10-40%) y un acondicionamiento a $47 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 6-9 días y aireación de $140 \text{ a } 200 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (porcentaje de aire nuevo reciclado de 5-35%). Las instalaciones utilizadas en esta fase son túneles de pasteurización similares a los utilizados en el cultivo del champiñón.

Tabla 2. Formulación de *A. blazei*, para la obtención final de 15 toneladas de compost, 1ª y 2ª formulación con “compost sin estiércol” y 3ª formulación con “compost clásico”.

1ª Formulación	Humedad (%)	Peso húmedo (kg)	Peso seco (kg)	Contenido de C (kg)	Contenido de N (kg)
Bagazo de caña	35	7.000	4.550	2.376	19,11
Brequearúa sp.	9	2.000	1.820	910	9,10
Harina de soja	8	550	506	227,7	35,4
Urea	0	50	50	-	22,5
S. de amonio	0	50	50	-	11,5
Sup. simple	0	100	100	-	-
Yeso	0	240	240	-	-
Cal calcítica	0	400	400	-	-
Peso Total		10.390	7.716	3.513,7	97,61
RELACIÓN C/N – 36/1			% N – 1,31	RELACIÓN N INOR/ORG – 0,53	
2ª Formulación	Humedad (%)	Peso húmedo (kg)	Peso seco (kg)	Contenido de C (kg)	Contenido de N (kg)
Bagazo de caña	35	7.000	4.550	2.247	18,20
Paja de avena	11	2.500	2.225	938	21,14
Harina de soja	8	400	368	165	25,76
Urea	0	40	40	-	18,0
S. de amonio	0	45	45	-	10,3
Sup. simple	0	100	100	-	-
Yeso	0	240	240	-	-
Cal calcítica	0	400	400	-	-
Peso Total		10.725	7.968	3.350,0	93,4
RELACIÓN C/N – 36/1			% N – 1,21	RELACIÓN N INOR/ORG – 0,43	
3ª Formulación	Humedad (%)	Peso húmedo (kg)	Peso seco (kg)	Contenido de C (kg)	Contenido de N (kg)
Bagazo de caña	40	7.000	4.200	2.100	29,4
Paja de avena	11	1.500	1.335	563	12,6
Aruana	9	1.000	910	449	5,7
Gallinaza	30	600	420	142	6,3
Harina de soja	8	150	138	62	9,66
Urea	0	40	40	-	18,0
S. de amonio	0	40	40	-	9,2
Sup. simple	0	100	100	-	-
Yeso	0	240	240	-	-
Cal calcítica	0	250	250	-	-
Carb. cálcico	0	300	300	-	-
Peso Total		11.220	7.973	3.316,0	90,86
RELACIÓN C/N – 36,5/1			% N – 1,21	RELACIÓN N INOR/ORG – 0,42	



Figura 2: A la izquierda, foto de una maquina utilizada para voltear el compost (semi-mecanizada, pues todavía necesita mano de obra); a la derecha, cordón de compost (“caixote”) formado durante la fase I del proceso de producción.

Un buen proceso de compostaje (Fases I y II), supone el 50% del éxito del cultivo de *A. blazei*. Otros factores fundamentales son: Inóculo o “spawn” de alta calidad, instalaciones adecuadas, capa de cobertura e inducción de los carpóforos adecuada y control de las plagas y enfermedades (factor crítico en este cultivo debido a las elevadas temperaturas que se alcanzan durante la producción).

Tabla 3. Operaciones a realizar durante la Fase de compostaje (1° Formulación).

Días	Procedimiento
01	Humedecimiento de la Braquiária y del bagazo de caña (montaje del cordón).
04	1° Volteo del compost y adición de agua.
07	2° Volteo del compost y adición de harina de soja y agua.
10	3° Volteo y adición de agua y aditivos*.
13	4° Volteo y adición de agua.
15	5° Volteo y adición de agua y yeso.
17	Último volteo y adición de agua.
20	Llenado del túnel de pasteurización.
31	Final de la Fase II del compostaje e inoculación.

OBS: Todos los días se adiciona agua y se comprueba que el compost posee un 65% de humedad.

* Urea, Sulfato de amonio, Superfosfato simple y Cal calcítica.

INOCULACIÓN Y DESARROLLO DEL MICELIO

La cantidad de inóculo utilizada en esta fase puede variar entre el 0,8 y el 1,5%, en relación al peso húmedo del compost. La mayoría de las veces, el cultivo de *A. blazei* tiene lugar en bolsas de plástico de 10 a 12 kg de sustrato, pero también puede realizarse en cajas de plástico y en estanterías (70-90 kg por m²).

La temperatura ideal para el desarrollo del micelio es de $28 \pm 2^\circ\text{C}$; con esta temperatura el proceso dura unos 12-15 días. Esta temperatura y este tiempo son habituales en la mayoría de los cultivos brasileños. Debido a la falta de información y de asistencia técnica, pocos son los productores de compost y muchos los compradores del mismo.

El compost colonizado con el micelio de *A. blazei* tiene una coloración mas blanca que el compost colonizado por *A. bisporus*, debido a la densidad del micelio que se desarrolla fácilmente entre el compost (Figura 3).

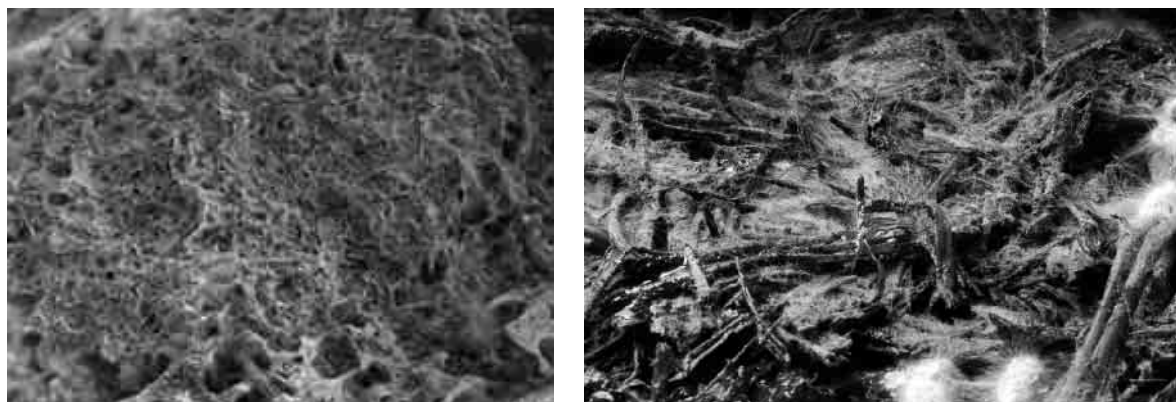


Figura 3. A la izquierda, compost colonizado por *A. blazei*; a la derecha, compost colonizado por *A. bisporus*.

CAPA DE COBERTURA

Para la elaboración de la capa de cobertura se utiliza suelo mineral como material de base (75% del volumen total). Durante el período 2005-2006, se realizó un estudio para conocer cuales eran los materiales más utilizados en la capa de cobertura, para el cultivo de *A. blazei*, en la provincia de Piedade (São Paulo). Los materiales mas utilizados fueron suelo mineral (50%), suelo mineral + carbón (37,5%) y suelo mineral + carbón + vermiculita (12,5%). Con respecto a los correctores aplicados a la capa de cobertura, el 75% de los cultivadores utilizaron carbonato cálcico, el 12,5% cal calcítica y el 12,5% cal dolomítica, para alcanzar un pH entre 6,5-7,0 (Andrade *et al.*, 2006).

Debido al elevado uso de suelo mineral en la capa de cobertura, Zied (2008) estudió las características físicas, químicas y microbiológicas de los diferentes tipos de suelos. El autor resalta que para obtenerse alta productividad, el suelo debe tener 556 g kg⁻¹ de arena, 102 g kg⁻¹ de limo y 342 g kg⁻¹ de arcilla, densidad de 1,0-1,1 g cm⁻³, capacidad de retención de agua de 40-50%, contenido de Al+H menor de 15 mmol_c dm⁻³ y un valor de saturación de bases por encima del 70%.

Este suelo debe mezclarse con otros materiales, que reduzcan la densidad y la compactación de la capa de cobertura, causada por las irrigaciones diarias, y que aumenten la porosidad y la capacidad de retención de agua. La Tabla 4 muestra los valores de productividad y el número y masa de los carpóforos obtenidos a partir de 4 capas de coberturas diferentes: suelo mineral + carbón vegetal, suelo mineral + corteza de pino compostada, suelo mineral + fibra de coco y suelo mineral + turba rubia, siempre en proporción 3:1 v/v.

Tabla 4. Valores de productividad (kg de carpóforos/12 kg de compost); peso unitario de carpóforo (productividad dividido por el número de carpóforos) y número de carpóforos (recogidos en 12 kg de compost).

Variables analizadas	Capa de cobertura a base de suelo mineral (3:1, v:v)			
	Carbón	Turba	Corteza de pino	Fibra de coco
Productividad (kg)	1,833 a	1,656 a	1,923 a	1,492 a
Masa de los carpóforos (g)	19,51b	20,43 b	17,64 b	22,14 a
Número de carpóforos (u)	93,96 a	81,0 a	109,29 a	67,39 b

Letras minúsculas distintas entre líneas, muestran diferencias significativas al test de Tukey (5%).

La capa de cobertura a la que se adicionó corteza pino fue la que obtuvo mayor productividad, seguida de la cobertura a base de carbón, la turba rubia y la fibra de coco. No obstante, deben resaltarse dos factores importantes: 1) Desde el punto de vista económico, destaca la capa de cobertura a la que se adicionó carbón, debido al bajo costo de este residuo, en el estado de São Paulo (Brasil), a lo que se suma la alta productividad observada; 2) Las características físicas finales de los carpóforos recogidos en la capa de cobertura a la que adicionó de fibra de coco son extraordinarias con vistas a la exportación del hongo (las cuales siguen un patrón – Ver el epígrafe sobre procesamiento y comercialización).

Debemos resaltar que el suelo mineral utilizado en el cultivo debe pasar por un proceso de corrección del pH, hasta alcanzar un valor de 6,5-7,0. Se recomienda la utilización de una fuente de calcio con bajo contenido en magnesio, como carbonato cálcico o cal calcítica. La operación de corrección se realizará 5 días antes de la aplicación de la cobertura (Ver resultados obtenidos en el Exp 1, Figura 6).

Cuando la cobertura utilizada se compone de suelo mineral y de residuo de carbón vegetal, habitualmente, no es obligatorio el tratamiento fitosanitario (realizado con vapor o con formol y otros fungicidas), principalmente cuando el suelo se ha extraído a 2 m de profundidad, lejos del efecto rizosférico de las plantas y procede de regiones donde no existen cultivos comerciales a gran escala. En cambio, cuando se adicionan materiales ricos en materia orgánica y con gran cantidad de macro y micronutrientes fácilmente asimilables, se recomienda un tratamiento fitosanitario previo de la capa de cobertura.

El tratamiento fitosanitario puede ser:

-Físico: Se utiliza vapor durante 5-7 horas a 60-65°C. Se recomienda humedecer la capa de cobertura antes de iniciar el tratamiento (para mejorar la transmisión de calor).

-Químico: Mediante formol se humedece el suelo, posteriormente, la capa de cobertura se amontona hasta alcanzar los 25 cm de altura y con ayuda de un mango de escoba se abren algunos orificios por los que se introduce una solución de 1 l de formol en 10 l de agua, para aproximadamente 1m³ de material a desinfectar; tras lo cual se mantiene el material cubierto con plástico negro durante 4-5 días.

Para ambos tratamientos fitosanitarios se recomienda utilizar la capa de cobertura pasados 2-3 días.

INSTALACIONES UTILIZADAS EN EL PROCESO PRODUCTIVO

En Brasil, el 45% de los cultivadores utilizan invernaderos para la producción de *A. blazei*, seguido de barracones alineados de “Tetra Pak” (45%), cultivo al aire libre (6%), cultivo en cámaras climatizadas (3%) y cultivo rústico en bosques (1%). La figura 4 ilustra las instalaciones utilizadas en Brasil. El único ambiente totalmente controlado son las cámaras climatizadas; los invernaderos y los barracones alineados apenas poseen control de la humedad y la temperatura.

Debido al cambio climático actual, ya no se puede esperar un comportamiento climatológico clásico (época de frío = $17 \pm 5^{\circ}\text{C}$); época de calor = $28 \pm 4^{\circ}\text{C}$), por lo que algunos cultivadores buscan financiación por parte de las instituciones oficiales, para modernizar sus instalaciones. No obstante, esta situación se presenta a pequeña escala, a pesar de que el producto adquiere altos precios en determinadas épocas del año, debido a la baja productividad.

De acuerdo con las instalaciones existentes y la época del año, se establece el método de producción en los cultivos: cajas o bolsas de plástico (10-14 kg de compost) y estanterías (50-100 kg de compost por m²).



Figura 4. Instalaciones utilizadas en el proceso productivo: A) Cultivo en invernaderos; B) Barracones alineados; C) Al aire libre; D) Cámaras climatizadas; y E) Estructuras rústicas en bosques.

INDUCCIÓN DE LOS CARPÓFOROS Y COSECHA

La fructificación ocurre, por término medio, 23 días después de la adición de la capa de cobertura. En el cultivo de *A. blazei* no se lleva a cabo la operación de rastrillado, tampoco las aplicaciones convencionales de insecticida y funguicida tras la adición de la capa de cobertura y a lo largo del cultivo, ya que este hongo se utiliza con fines medicinales, terapéuticos y farmacológicos.

En la tabla 5 se recogen las condiciones ambientales recomendadas para el desarrollo del ciclo de cultivo. En los cultivos en invernaderos y en barracones alineados (que poseen control limitado sobre las condiciones ambientales), la inducción de los primordios para cada florada y las floradas de producción quedan a expensas de las condiciones ambientales externas.

En las cámaras de cultivo climatizadas esto no ocurre, de forma que pueden conseguirse 6 floradas de cosecha en un mismo ciclo de producción (120 días – Figura 6) y 3 ciclos de producción al año. En el cultivo en invernaderos y barracones alineados también se consiguen 3 ciclos de producción al año (con un número indeterminado de floradas), aunque uno de ellos presenta escasa rentabilidad. La Figura 6 muestra el comportamiento de las floradas en el cultivo en función de las condiciones ambientales, en cultivo controlado y semi-controlado (120 días de producción a partir de la aplicación de la capa de cobertura).

Tabla 5. Condiciones ambientales recomendadas para el cultivo de *A. blazei*. tras la aplicación de la capa de cobertura

Condiciones ambientales	Primeros 12 días	Inducción de los primordios	Floradas	Intervalo entre flujos
Temperatura del compost	$27 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$27 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$28 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Temperatura del aire	$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$18 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$26 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$27 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Humedad relativa	$90 \pm 2\%$	$85 \pm 2\%$	$82 \pm 2\%$	$85 \pm 2\%$
Contenido en CO_2	≥ 1.800 ppm	± 800 ppm	± 600 ppm	± 600 ppm

Para el cultivo en condiciones controladas, se mantiene la temperatura inicial de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante, aproximadamente, 12 días. Después, se incrementa la ventilación y se reduce el contenido en CO_2 y la temperatura del compost (2°C por día); transcurridos 16-17 días tras la adición de la capa de cobertura, la temperatura alcanza los $\pm 20^{\circ}\text{C}$, permaneciendo durante 48 horas. Posteriormente, se eleva la temperatura del compost 2°C por día, hasta que alcance los $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (donde ya se observa la presencia de algunos carpóforos). Después de la cosecha se recomienda que la temperatura del compost permanezca a 28°C durante 7 días, para nuevamente empezar a disminuir la temperatura 2°C por día, para una nueva florada de producción (Figura 5).

En condiciones semi-controladas es difícil inducir un flujo intencionadamente; estos tienen lugar de acuerdo a las condiciones ambientales externas. En la Figura 5, se observa como siempre que se produce una reducción en la temperatura del compost, de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, se produce un flujo de cosecha, como se pone de manifiesto a los 23, 40, 54, 69, 95 y 102 días tras la adición de la capa de cobertura. A veces, la cosecha en estas condiciones puede realizarse diariamente, debido a la falta de definición de las floradas; esto difiere de la cosecha en condiciones controladas donde hay 6 floradas bien definidas, cada una de 5 días de duración, lo que totaliza 30 días de cosecha en un total de 120 días de producción.

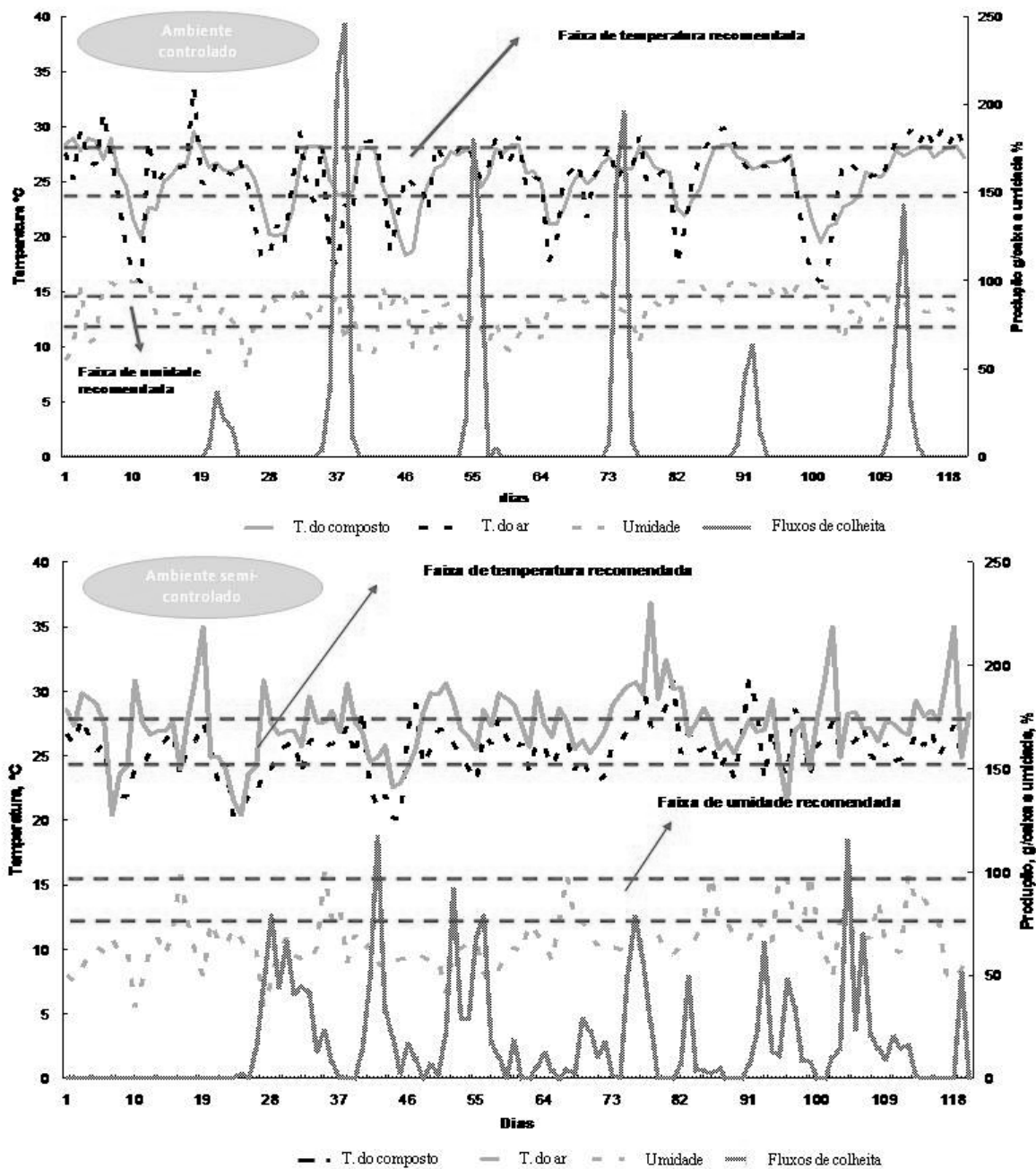


Figura 5. Esquema de 120 dias de produção, em condições controladas (câmaras climatizadas) e semi-controladas (invernaderos e barracões alinhados), em função da temperatura do composto, de la del aire (°C) y de la humedad relativa (%).

Se han realizado diversos estudios sobre la productividad de *A. blazei*. En la figura 6 se resumen algunas de estas investigaciones; se observa una variación en la productividad de 0,60 a 2,25 kg de hongos recogidos en 12 kg de compost.

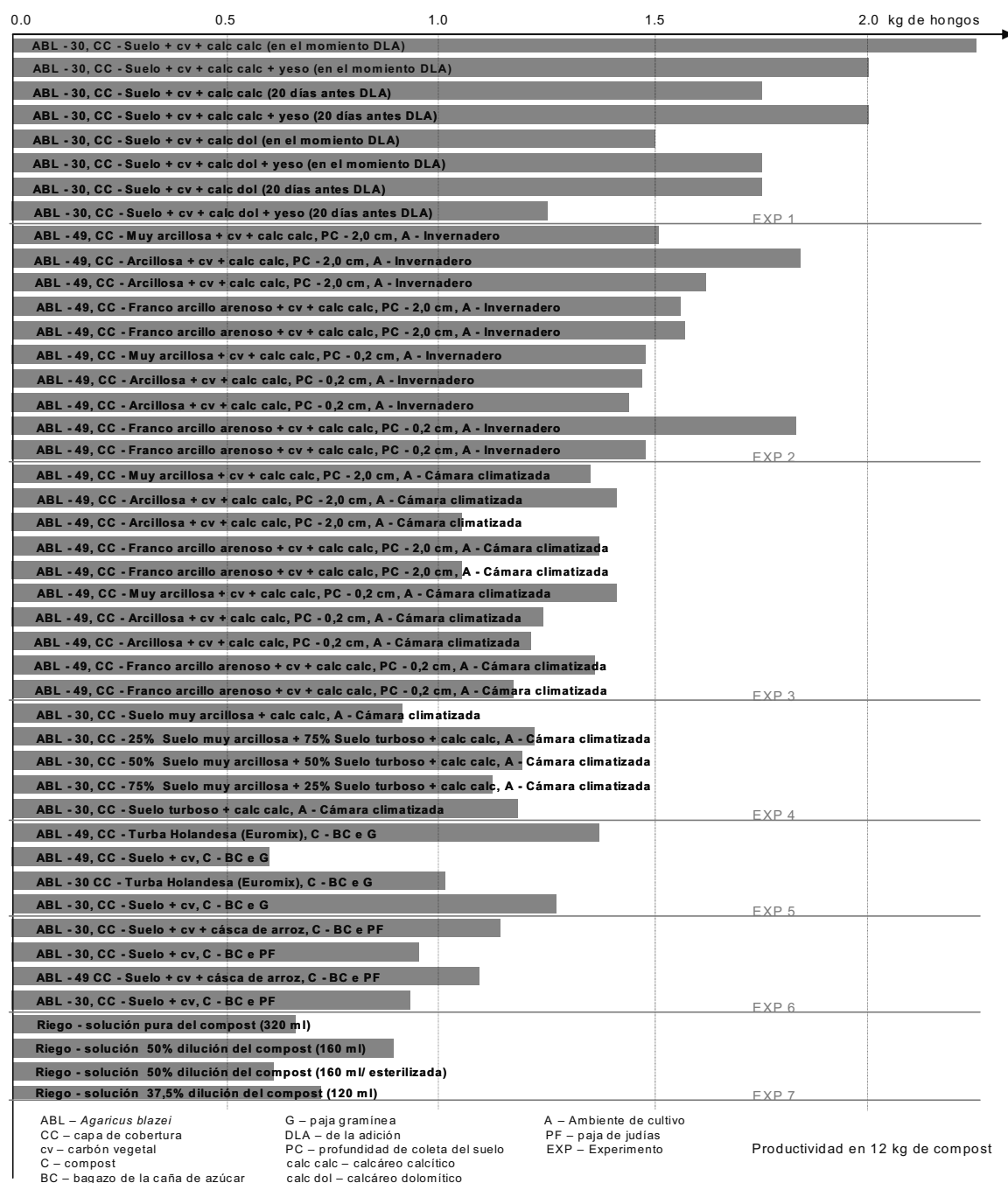


Figura 6. Productividad de *A. blazei* en función de la variedad, el compost, la capa de cobertura, las condiciones ambientales del cultivo y el tipo de riego (datos facilitados por Zied y colaboradores a partir de sus experiencias de los años 2005 a 2009).

PROCESAMIENTO Y COMERCIALIZACIÓN

Una vez recogido el hongo, debe eliminarse el exceso de tierra de la base del pie, luego los carpóforos son lavados, cortados y deshidratados (Figura 7).

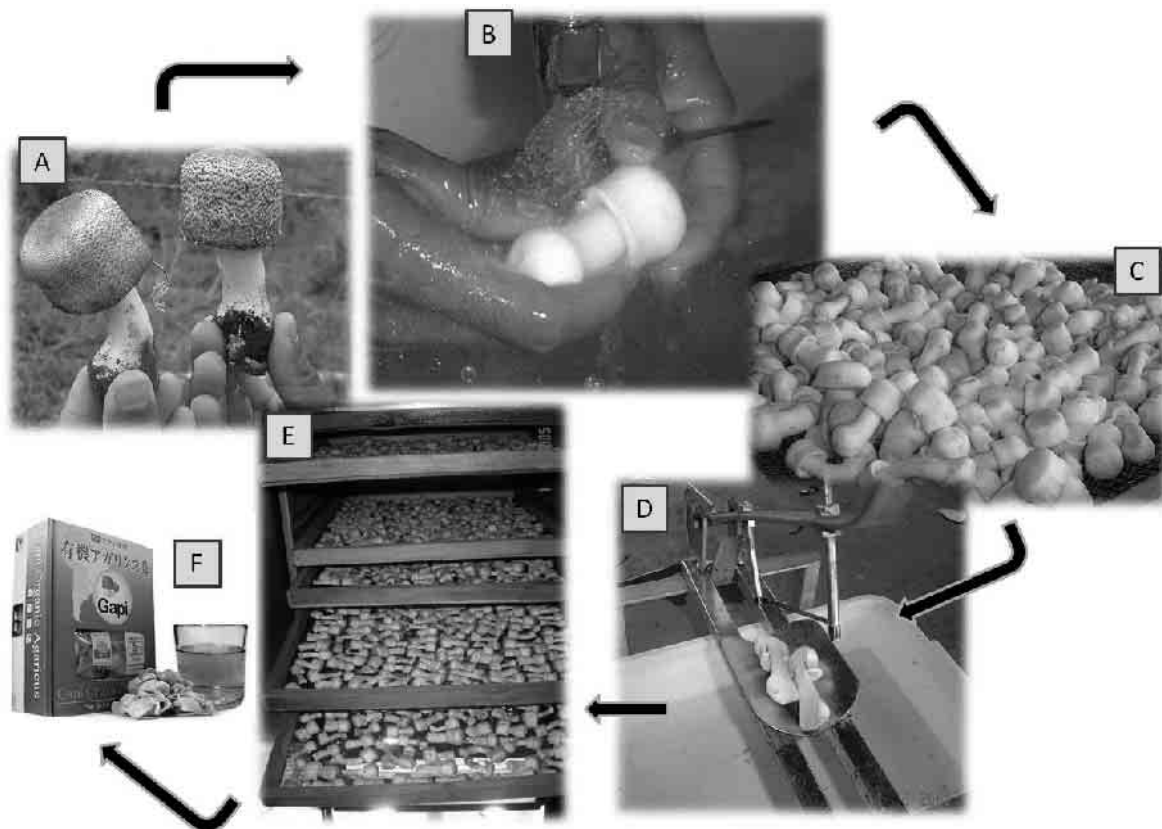


Figura 7: Esquema del procesamiento de los hongos recogidos: A) Carpóforos recién recogidos; B) Lavado; C) Carpóforos ya lavados; D) Cuchilla de corte; E) Deshidratador; y F) Producto final para la exportación.

Los carpóforos de *A. blazei* son comercializados deshidratados enteros (cuando se cosechan con el sombrero cerrado) o triturados en forma de polvo (para cápsulas o sacos de té). Cuando se recogen con el sombrero abierto, debido al exceso de hongos en la florada, el cultivador no consigue lavarlos a tiempo, o el sombrero se abre dentro del deshidratador (como se recoge en la fotografía del día 06/02 – 7:46, Figura 8), los hongos son vendidos a un precio un 70% inferior al valor de los hongos comercializados con el sombrero cerrado.

Como los hongos pueden ser comercializados enteros o triturados, se sugiere que los carpóforos recogidos los días 05/02 de las 9:34 a las 13:37 (Fig. 8), sean comercializados enteros, siguiendo las normas internacionales del país importador, mientras que los carpóforos recogidos después del día 06/02 a las 7:46 (Fig. 8), pueden comercializarse triturados, ya que

aunque tienen el sombrero abierto, mantienen sus propiedades medicinales y su color (Eira, 2003 – Tabla 6).

El mayor país importador de *A. blazei* es Japón, cuyas normas de clasificación son las siguientes:

- Hongo Extra: Altura de 5 a 8 cm, ancho de la base del pie de 3,5 a 5,0 cm, coloración amarillo-pajizo (bien claro). Sombrero cerrado.
- Hongo A: Altura de 3 a 5 cm, ancho de la base del pie de 1,5 a 3,5 cm, coloración amarillo-pajizo (bien claro). Sombrero cerrado.
- Hongo B: Altura de 2 a 5 cm, ancho de la base del pie de 0,3 a 3,0 cm, coloración amarillo-rojizo (oscurecido debido al proceso de oxidación y a una deshidratación incorrecta). Sombrero cerrado.
- Hongos Abiertos. Altura de 2 a 8 cm, ancho de la base del pie de 0,3 a 5,0 cm, coloración amarillo-rojizo (oscurecido o no, debido el proceso de oxidación y deshidratación). Sombrero abierto.

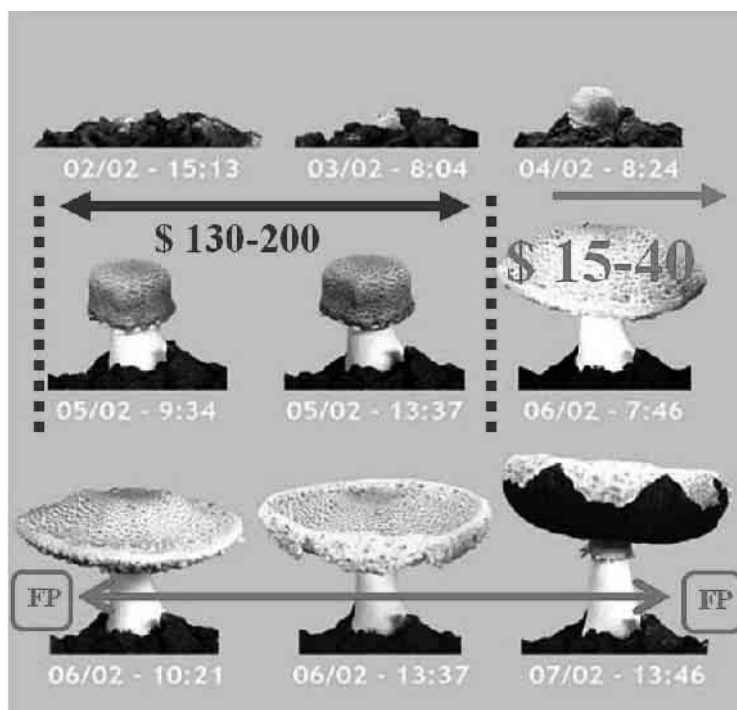


Figura 8: Estados de desarrollo del hongo y sus respectivos valores comerciales actuales (FP: fuera de norma, se recomienda la trituración de estos hongos para dar valor al producto).

Existen pocos estudios relativos a la composición química de *A. blazei*, sobre todo, en cuanto al contenido en lentinan y β -glucano. En la actualidad, el Módulo de Cogumelos de la Facultad de Ciencias Agronómicas (FCA) de la Universidad Estatal Paulista (UNESP) está

desarrollando un gran proyecto de investigación con el objetivo de definir cuales son las prácticas de producción que potencian la cantidad de β -glucano y otros componentes químicos de los carpóforos finales recogidos. También pretende establecer un protocolo de cultivo, con normas y reglas a seguir, que mejoren la calidad del hongo con vistas a la exportación.

ENFERMEDADES Y PLAGAS

El cultivo de *A. blazei* es susceptible al ataque de diversas enfermedades (hongos, bacterias y virus) y plagas (moscas, ácaros y nematodos), debido principalmente a las elevadas temperaturas y humedades que se alcanzan durante la fase de producción (25–29°C y 82–90%, respectivamente), ideales para el desarrollo de las mismas.

Las enfermedades las producen agentes patógenos que causan daños directamente sobre el hongo cultivado, pudiendo ser hongos (*Verticillium fungicola* y *Mycogone perniciosa*) y también bacterias (*Pseudomonas tolaasii*), pero también pueden aparecer microorganismos competidores, que a pesar de no ser parásitos de los hongos, se desarrollan en el compost o en la capa de cobertura, reduciendo la cantidad de nutrientes disponibles o produciendo sustancias tóxicas que retardan o impiden el desarrollo de los hongos (Figura 9).

Los hongos patógenos más frecuentes son: *V. fungicola*, conocido popularmente como “Mole seca” o “Bob” y *M. perniciosa* conocida como “Mole húmeda”; ambos son considerados, desde la antigüedad, como los mayores enemigos de los cultivadores de hongos debido a su agresividad y su amplia distribución geográfica (hongos cosmopolitas). Pueden aparecer en cualquier estado de desarrollo de *A. blazei*: fase micelial, fase inicial de la producción y fase final de la producción.

Cuando se desarrollan junto al micelio del hongo, tanto en el compost como en la capa de cobertura, los daños causados pueden disminuir la productividad en un 30-60%. El daño más común es la formación de tejidos (hongo con forma globosa y piramidal – Figura 9A). En la fase inicial de producción, el parásito puede invadir los tejidos del pie, causando algunas aberturas, que dejan los hongos retorcidos. La fase final del desarrollo de estos hongos coincide con el final de la producción, apareciendo sobre todo en los cultivos comerciales poco tecnificados. El hongo presenta algunas manchas irregulares de coloración canela en la superficie del sombrero, resultante de la germinación de las esporas presentes en el ambiente (pérdidas del 3% son frecuentes con este tipo de contaminación).

Las principales fuentes de contaminación fúngica son: Compost mal preparado y micelio “semilla” y materiales de cobertura de calidad reducida. La presencia de esporas alrededor de las instalaciones de producción también pueden ser un problema, principalmente en ambientes con poca protección contra el viento (cortinas, mallas, mantas o filtros), humedades excesivamente altas y temperaturas por encima de 26°C.

Las enfermedades bacterianas aparecen en menor escala, pero también pueden ser frecuentes en cultivos con alta humedad y deficiente ventilación; el principal síntoma de una contaminación bacteriana es la aparición de manchas pálidas en el sombrero que se oscurecen a tonos marrón-chocolate. La presencia de pequeñas gotas de agua de color amarillo claro en el sombrero y en el pie, son indicadores de contaminación bacteriana (Figura 9B). Las moscas, ácaros y otras plagas contribuyen a la diseminación de estos patógenos.

Entre las plagas que atacan los cultivos, tres merecen mayor atención: Moscas, ácaros y nematodos. Las moscas son atraídas por el olor del compost (materiales utilizados en la formulación y el proceso de compostaje), el hongo y los restos de cosecha que acaban generando una acumulación de materia orgánica. Algunas especies de moscas se desplazan rápidamente (*Phoridae*), otras son más lentas (*Sciaridae*), algunas, durante el proceso reproductivo, pasan por el estado de larva y pupa, otras como las de la familia *Cecidomidae* se reproducen por pedogénesis, o sea, varias larvas pueden originarse de una única madre.

El ciclo de vida de estas moscas se completa en 15-42 días, pudiendo depositar cada hembra una media de 50-200 huevos, la mitad de ellos hembras. Un método de control recomendable para disminuir la presencia de moscas en las instalaciones es la utilización de trampas luminosas (impregnadas de cola entomológica – Figura 10), pues impide su reproducción y la puesta de huevos.

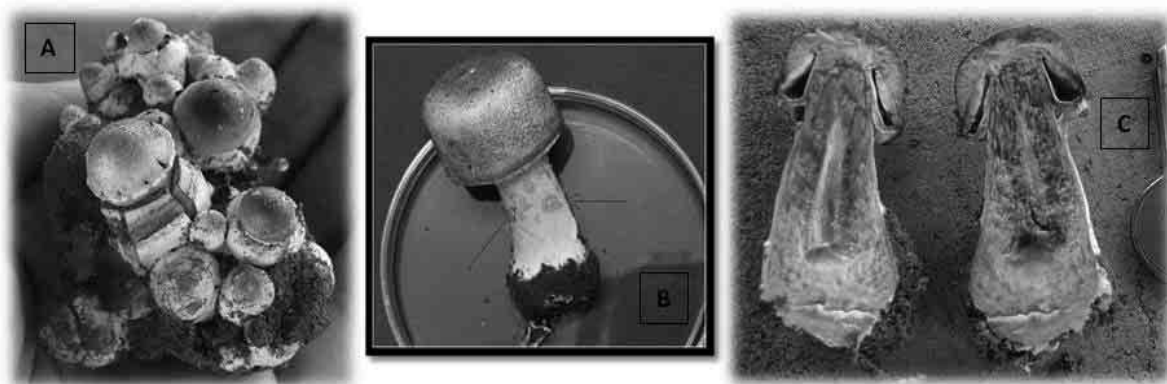


Figura 9. A: Deformación en los carpóforos debido a la presencia de *Verticilium fungicola* (hongos con aspecto globoso), B: Presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, y C: Vista interna de los carpóforos infectados por *Mycogone* (mole húmeda).

Los síntomas que se observan son debidos al ataque de las larvas y no de las moscas, ya que hacen galerías en el sombrero y en el pie de los hongos, depreciando el valor del producto final. Las larvas se alimentan del micelio de *A. blazei* y de otros hongos contaminantes. También es importante resaltar que algunas moscas presentes en el cultivo se alimentan de materia orgánica, por lo que debe prestarse mucha atención en las fases de

producción, donde todavía no está el micelio presente (producción del compost, pasteurización y acondicionamiento y desarrollo del micelio).



Figura 10. A: Moscas en el carpóforo de *A. blazei*, B: Trampa luminosa impregnada de cola entomológica y C: Vista cercana de la trampa con las moscas muertas.

Los ácaros se encuentran habitualmente en el compost y en la capa de cobertura, poseen hábitos micófagos y se pueden alimentar de materia orgánica. Normalmente se les observa después del riego de la capa de cobertura, ya que poseen coloración ferruginosa y se desplazan continuamente; la presencia de telarañas en las estanterías del cultivo, pueden ser un indicador de la presencia de los ácaros.

Por último, los nematodos son organismos microscópicos, que poseen un ciclo de vida de 15-28 días y elevada fertilidad (cada hembra pone 30-250 huevos). Pueden encontrarse en la capa de cobertura y en el compost, sobre todo con un proceso de pasteurización inadecuado y exceso de humedad.

Es importante resaltar que no existe ningún biocida (insecticida, fungicida, acaricida, etc.) registrado para su aplicación en el cultivo de *A. blazei*, siendo muy importante la adopción de técnicas de cultivo que eviten o minimicen la presencia de enfermedades y plagas, tales como: Adquisición de “semilla” de calidad, preparación, manejo y formulación adecuada del compost, higienización total de las instalaciones de cultivo y sus alrededores, selección del material, desinfección y corrección del pH de la capa de cobertura y, finalmente, control riguroso de las condiciones ambientales durante el proceso de fructificación y cosecha de los hongos.

CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES Y MEDICINALES

Los hongos desde el tiempo remoto eran utilizados con fines nutricionales y medicinales (medicina popular) para combatir hemorragias, cólicos, heridas, asma, deficiencia de vitamina D, etc. (Vedder, 1996). Según la especie del hongo se pueden observar diferentes características nutricionales y medicinales; en un Proyecto Temático sobre “Cogumelos Comestíveis e Mediciniais” se verificó que *A. blazei* es más rico en proteína y β -glucano y similar en fibras, minerales y grasa que *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis bromatológico y contenido de β -glucano en carpoforos de *A. blazei* (ABL) en relación a otros hongos comestibles (*P. ostreatus* – POS y *L. edodes* – LED).

Hongo	Estadio de crecimiento	Proteína bruta, %	Extracto etéreo, %	Minerales, %	Fibra bruta, %	g de β -glucano/100g hongo deshidratado
ABL 25	P*. abierto	39,18	3,33	7,59	7,83	0,522
	P. cerrado	33,40	3,00	7,27	9,71	0,676
ABL 26	P. abierto	35,03	3,13	7,33	6,93	0,473
	P. cerrado	35,88	2,75	7,51	8,46	0,548
ABL 30	P. abierto	29,36	1,53	6,84	11,06	0,398
	P. cerrado	33,71	2,89	7,09	6,14	0,487
POS		23,28	2,56	7,05	10,86	0,413
LED		19,49	3,50	4,40	12,36	0,212

* P – pileo, Fonte: Eira, 2003.

La búsqueda de sustancias o métodos que aumenten o potencien el sistema inmunológico del cuerpo humano, con objeto de inducir una resistencia sin causar efectos colaterales perjudiciales al organismo, ha sido uno de los principales objetivos de la ciencia en la cura del cáncer. Dado que los estudios sobre las propiedades medicinales de *A. blazei* en seres humanos no están concluidos, no puede ser referenciado todavía como un “hongo medicinal” y si como un alimento funcional o un hongo utilizado como complemento alimentario (nutricional). Recientemente, Leifa (2002) desarrolló su trabajo de doctorado con la producción extracelular de polisacáridos de *A. blazei* en cultivo sumergido y sus efectos antitumorales, concluyendo que un polisacárido soluble en agua, de peso molecular (PM) $2,09 \times 10^6$ fue eficiente para el control del Sarcoma 180 en ratones. Ya Kaneno (2003), en una segunda etapa de investigación verificó en ensayos realizados con fracciones de extractos solubles de oxalato de amonio (extracto ATF) mostraron resultados de inmunomodulación significativos, controlando el desarrollo del Tumor de Ehrlich en ratones (Figura 11),

probablemente debido a la migración selectiva de linfocitos T hacia los sitios de implantación del Tumor (un tipo de citocina, que afecta directamente las células del tumor).

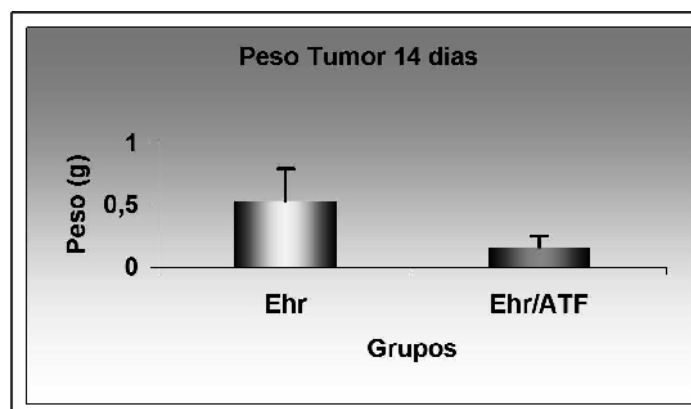


Figura 11. Control del tumor de Ehrlich con el extracto ATF del *A. blazei*.

De esta manera se deben desarrollar muchos estudios e investigaciones en base a sus propiedades medicinales y también en técnicas de cultivo que potencien la presencia de sustancias farmacológicas en el carpóforo, como: variedad a ser utilizada, ambiente de cultivo (iluminación, variación de temperatura, etc.), materias primas usadas en la formulación del compost, consumo del hongo con el píleo abierto o cerrado, duración del ciclo de cultivo y número de floradas, métodos de deshidratación, entre otros factores que seguramente afectan a la constitución química final de los hongos comercializados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la Coordinación de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES - No. 1184/09-1), el programa post-grado Energía en Agricultura en la Facultad de Ciencias Agronómicas (FCA/UNESP, Brasil), la Consejería de Agricultura de Castilla-La Mancha y la Diputación Provincial de Cuenca.

REFERENCIAS

- ANDRADE, M. C. N., MINHONI, M. T. A., KOPYTOWSKI FILHO, J., ZIED, D. C. (2006). Camadas de cobertura mais utilizadas na região de Piedade/ SP para o cultivo de *Agaricus blazei*. In: III Simpósio Internacional sobre cogumelos no Brasil, São Paulo-SP, Brasil.
- CAMELINI, C.M., MARASCHIN, M., MENDONÇA, M. M., ZUCCO, C., FERREIRA, A. G., TAVARES, L.A. (2005). Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters* **27**(17), 1295-1299.

- EIRA, A. F. (2003). Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). Aprenda fácil, Viçosa, Brasil, 398 pp.
- FORTES, R. C., CARVALHO, M. R., NOVAES, C. G. (2006). Effects of dietary supplementation with agaricales mushrooms and other medicinal fungus on therapy against the cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia* **52**(4), 363-371.
- HEINEMANN, P. (1993). Agarici Austroamericani. VIII. Agariceae des regions intertropicales d'Amérique du Sud. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* **62**, 355-384.
- KANENO, R. (2003). Imunomodulação "in vivo". In: Cultivo do cogumelo medicinal: *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.), pp. 70-72. Eira, A, F. (Ed.). Aprenda fácil, Viçosa, Brasil.
- KERRIGAN, R. W. (2005). *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia, Philadelphia*, 97, 12-24.
- KOPYTOWSKI FILHO, J. (2002). Relação C/N e proporção das fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* Murril e poder calorífico do composto. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 101 pp.
- LEIFA, F. (2002). Production of extra-cellular polysaccharide from *Agaricus blazei* by submergerd and solid state cultura and its antitumor effect. Doctor Thesis in Biotechnological Process, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil, 111 pp.
- VEDDER, P. J. C. (1996). Cultivo moderno del champignon. Mundi-Prensa, Madrid, 369 pp.
- ZIED, D.C. (2008). Camadas de cobertura com diferentes combinações de solos e ambientes de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 120 pp.

Cultivo de Shiitake, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, en sustrato formulado

Diego Cunha Zied¹, José Emilio Pardo González², Arturo Pardo Giménez³, Marli Teixeira de Almeida Minhoni¹

¹Módulo de Cogumelos, Departamento de Produção Vegetal (Defesa Fitossanitária), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, FCA/UNESP. Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, s/n. 02071 Albacete, España.

³Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), C/ Peñicas, s/n, Apartado 63. 16220 Quintanar del Rey, Cuenca, España.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de *L. edodes* actualmente representa una gran fuente de renta en la fungicultura mundial, siendo el segundo hongo comestible más producido en el mundo. Datos verificados en la literatura resaltan que la primera cosecha se produjo en China, aunque algunos autores indican que en Japón, hacia el año 100 aC, también se recolectaron especies nativas. Durante la dinastía Song, entre los años 969 y 1127, se realizaron en China cultivos rústicos de este hongo (Chang y Miles, 1989; Donoghue y Denison, 1995).

Según el país consumidor, éste puede ser encontrado bajo diversas nomenclaturas, como en Francia (Lectin), en Estados Unidos (hongo oscuro de la selva), en Japón y en China (Shiitake, hongo japonés de la selva y “Black Mushroom”). En España también podemos encontrarlo como Shiitake, aunque, de manera diferente a lo que ocurre en el resto del mundo, su consumo es escaso, muy por debajo del champiñón y las setas del género *Pleurotus*.

Inicialmente el cultivo de Shiitake era realizado en troncos de madera que eran cortados; luego comprobaron que si se golpeaban estos troncos, surgían las fructificaciones de los hongos; un poco más adelante, para el “choque térmico” sumergían los troncos en tanques con agua. Ya en 1974, se produjo el primer cultivo en serrín, en la ciudad de Shangai, China (Chen, 2005a).

Se trataba entonces del inicio de un cultivo más tecnificado y profesional, que poseía varias ventajas, como: menor tiempo de desarrollo del micelio y posterior producción, posibilidad de utilización de residuos agrícolas (serrín, pajas, harinas, salvados, etc.) y facilidad de manejo. Como consecuencia de esto también se presentaban algunos inconvenientes, como una mayor inversión en el cultivo, un consumo elevado de energía y la necesidad de mano de obra especializada.

Dentro del cultivo de Shiitake en sustrato formulado, podemos distinguir las siguientes etapas de producción: producción del inóculo o semilla (la mayoría de las veces variedades

diferentes de las utilizadas en cultivos en troncos), producción del sustrato, pasteurización o esterilización, inoculación, desarrollo del micelio y maduración y, finalmente, producción.

PRODUCCIÓN DE INÓCULO, SEMILLA O “SPAWN”

Para el desarrollo de la semilla de Shiitake, deben utilizarse medios de cultivo y sustratos adecuados a la nutrición del hongo. Es importante resaltar que los medios de cultivo excesivamente ricos pueden causar diversos desequilibrios nutricionales, causando irregularidades en el crecimiento de los hongos cuando se inoculan en los sustratos para la producción.

De esta forma, una semilla de calidad sigue un patrón y unas características químicas siempre uniformes (poco cambio de las formas y disponibilidad de los nutrientes), tanto para la producción de la matriz primaria, secundaria, terciaria y la semilla final que el fungicultor utilizará en la inoculación del sustrato de cultivo.

Dado que el Shiitake se desarrolla bien en troncos de madera, el medio de cultivo para la matriz primaria y secundaria es a base de serrín, al que se adiciona harina y carbonato cálcico. Para esto se prepara un sustrato con 200g de serrín + 40g de harina + 4 g de carbonato y se hierve en 1 litro de agua durante 10 minutos (Minhoni et al., 2007). A continuación este medio es filtrado y autoclavado durante 30 minutos a 121°C, tras lo cual se adicionan 15g de agar y transcurridas 24 horas se realiza otro autoclavado.

Con el medio de cultivo listo, éste se transfiere a placas de Petri, donde se hace la inoculación de la matriz primaria con el hongo seleccionado. La matriz primaria se incuba a 25°C durante aproximadamente 7 días y, una vez colonizada, se transfiere una porción de medio del cultivo + el micelio del Shiitake (discos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro) a otro conjunto de placas (éstas denominadas de matriz secundaria). La matriz secundaria es incubada a la misma temperatura y periodo de tiempo que la matriz primaria.

Para la producción de la matriz terciaria y la semilla se utiliza el mismo sustrato mencionado anteriormente (200g de serrín + 40g de harina. + 4g de CaCO₃), pero se adiciona agua hasta un contenido en humedad del 65%. Luego se transfiere este sustrato a frascos de vidrio (matriz terciaria) y bolsas de plástico (semilla) y se esteriliza durante aproximadamente 2 horas a 121°C.

Con el sustrato estéril, para la producción de la matriz terciaria se transfiere un fragmento (formato de pizza) de la matriz secundaria colonizada sobre el sustrato e inmediatamente se procede a la incubación a 25°C durante 10 días. Finalmente, con la matriz terciaria colonizada, se inocula la semilla en la proporción del 3% sobre peso húmedo del sustrato, dispuesto en bolsas de plástico para su utilización por parte del productor.

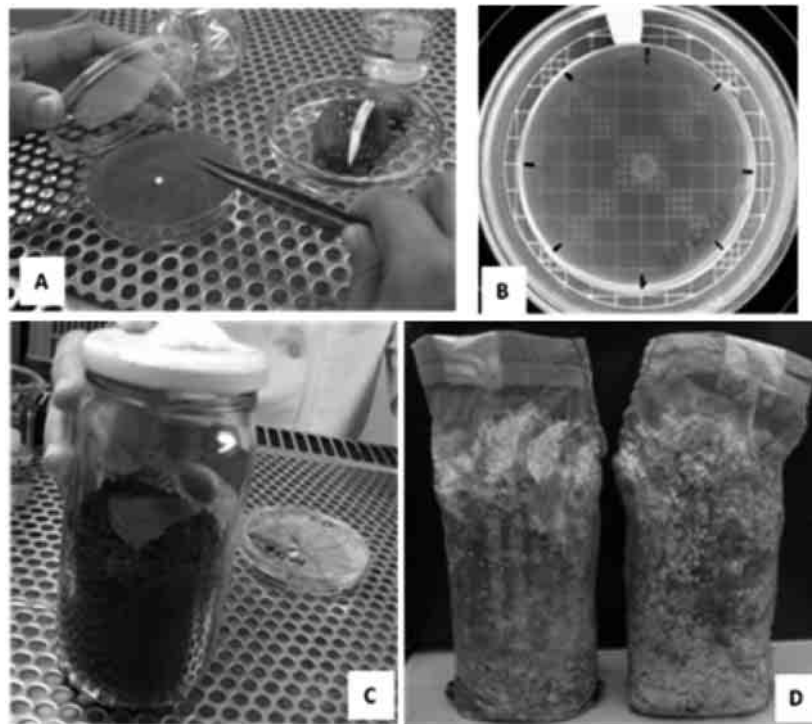


Figura 1: Producción de matriz primaria (A), secundaria (B), terciaria (C) y semilla (D).

PRODUCCIÓN DEL SUSTRATO

Para la producción del sustrato de Shiitake se utiliza una mezcla del material de base o de volumen (serrines, pajas, bagazo de caña, etc.) con los aditivos (harinas, carbonato, tortas, etc.), tras lo cual se adiciona agua para la corrección de la humedad ($\pm 65\%$) y se procede el tratamiento térmico.

De esta manera el componente voluminoso, siempre representa 70-80% de la composición del sustrato. El serrín es el material más utilizado, aunque actualmente, con el aumento de residuos orgánicos, se vienen utilizando diferentes materiales alternativos. Se deben considerar una serie de requisitos mínimos para la elección del material a ser utilizado como sustrato, entre los que destacan: bajo coste, continuidad de suministro, facilidad de adquisición y homogeneidad en sus características físicas y químicas.

Normalmente se utilizan diferentes especies de Eucalipto (*urophylla*, *grandis*, *camaldulensis* y *saligna*) y Roble (*acutissima*, *dentata*, *mongolica* y *serrata*), a las que se añaden harinas (trigo, arroz, soja, algodón, maíz, etc.) con el objetivo de mejorar las propiedades del sustrato, principalmente debido al aumento del contenido en nitrógeno y carbohidratos disponibles, lo que se traduce en un aumento de la velocidad de desarrollo del micelio y reducción de tiempo de fructificación, al compararlo con el cultivo en troncos.

Hay que tener en cuenta que contenidos elevados de nitrógeno se traducen en la formación de micelio menos denso y la frecuente aparición de *Trichoderma*. Así, el balance de nitrógeno y carbono se debe llevar a cabo tratando de establecer una relación C/N de 40-60/1 durante el crecimiento del micelio, para que en el momento de la florada éste se sitúe entre 55-80/1. El índice de pH recomendado durante el crecimiento del micelio es de 5,5-6,5 y para la fructificación 4,5-5,5. En la Tabla 1 se muestran varias formulaciones utilizadas en diversos países, de acuerdo con los materiales disponibles.

Tabla 1. Ejemplos de formulaciones de los sustratos para el cultivo de *L. edodes* (adaptación de Minihoni et al., 2007).

Serrín	Harinas	Salvados	Otros	Referencia
80% Roble	10% trigo	10% maíz		Royse <i>et al.</i> , 1985
80% Roble		10% trigo 10% mijo		Rinker, 1991
72% ⁽¹⁾		26% arroz	2% carbonato	Chang y Miles, 1989
94%	3-4% arroz 1% trigo o maíz		1% carbonato	Oei, 2003
80% Eucalipto	20% trigo		1-2% carbonato	Sant`anna, 1998
70-78% ⁽²⁾	20% maíz		2% carbonato	Kalberer, 2000

⁽¹⁾*Dalberia sisso*, *Acacia arabica* y *Populos alba*; ⁽²⁾70% Roble, 20% Haya y 10% Arce.

Se deben conseguir valores de este orden para la producción de un sustrato de calidad. Es de resaltar que, junto a las características químicas del sustrato, uno de los principales factores limitantes es la humedad de los bloques, que se correlaciona con la granulometría del serrín y los contenidos de O₂ y CO₂. De esta manera, fragmentos pequeños de serrín provocan un elevado contenido de CO₂, que generalmente ocasiona una anaerobiosis debido a la facilidad de retención de agua; por otro lado, partículas grandes de serrín pueden perforar la bolsa de plástico en el momento del prensado del sustrato al empaquetarlo.

En el proceso se utiliza diferente maquinaria, como puede observarse en la Figura 2. Estas máquinas son capaces de mezclar el serrín con las harinas y salvados, humedecer, empaquetar, prensar (haciendo a la vez los orificios donde la semilla será inoculada) y pesar, de acuerdo con la cantidad deseada. Con estas instalaciones se pueden hacer aproximadamente 100 bloques en 1 hora de trabajo.

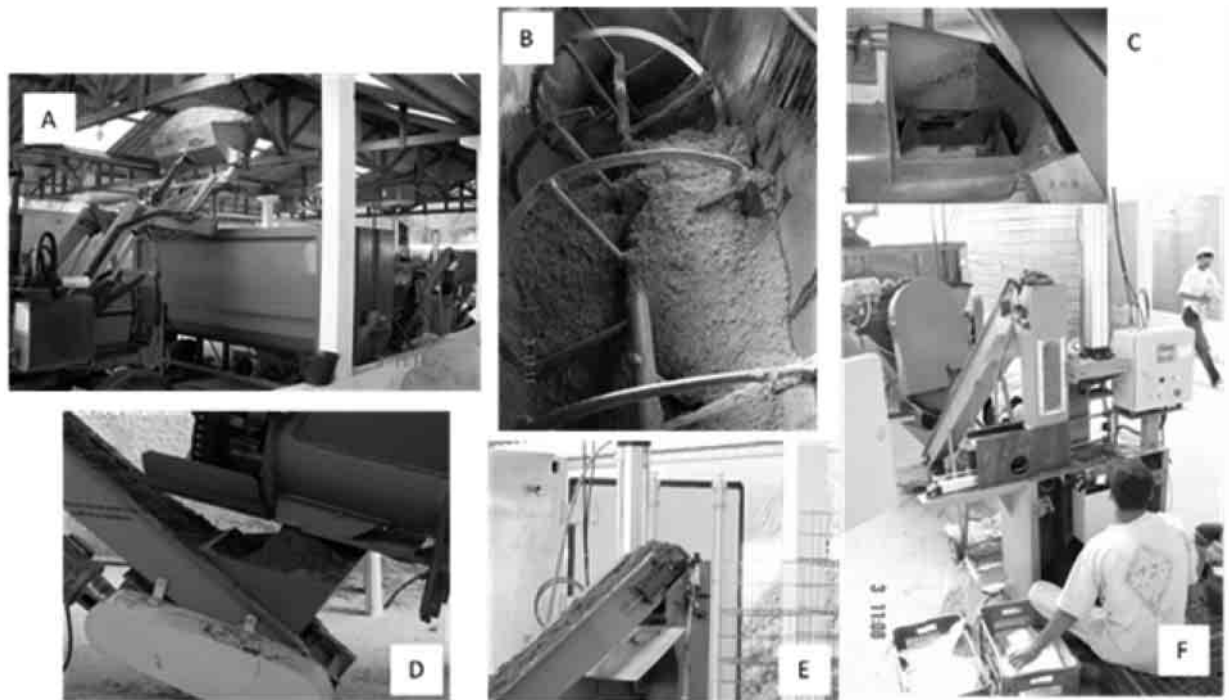


Figura 2: Máquina utilizada para la producción del sustrato: A – Pala cargadora colocando el serrín en el cilindro mezclador, B – Cilindro utilizado para mezclar el serrín, las harinas y el agua, C – Segundo cilindro mezclador, D – Cinta utilizada para transportar el serrín, E – Soporte y molde utilizado con la balanza y el formato final de los paquetes y F – Vista general de la máquina.

PASTEURIZACIÓN O ESTERILIZACIÓN

Con el sustrato elaborado y ya dentro de las bolsas de plástico (media 2 – 2,5kg de sustrato), se tiene la opción de escoger el tipo de tratamiento térmico que se va a hacer. El principal objetivo de esta etapa de la producción es reducir o eliminar la microbiota existente en el sustrato, que podría ejercer relaciones antagónicas con el Shiitake.

El tipo de tratamiento utilizado por el productor puede variar de acuerdo con los recursos financieros de los que disponga. La utilización del tratamiento por esterilización es más caro, de acuerdo con la utilización de materiales industriales, un consumo elevado de energía y la necesidad de laboratorio y cámara de flujo laminar para la inoculación, diferente del tratamiento con pasteurización. En cualquier caso, los riesgos y la posibilidad de pérdida de producción en los sustratos pasteurizados son mayores.

Según el tratamiento térmico, se puede elegir el tipo de bolsa (PEAD o PE). Estas deben disponer obligatoriamente de filtros (para permitir intercambios gaseosos y evitar la

contaminación con esporas de otros hongos), que son anexados en la parte superior de las bolsas (Figura 3).

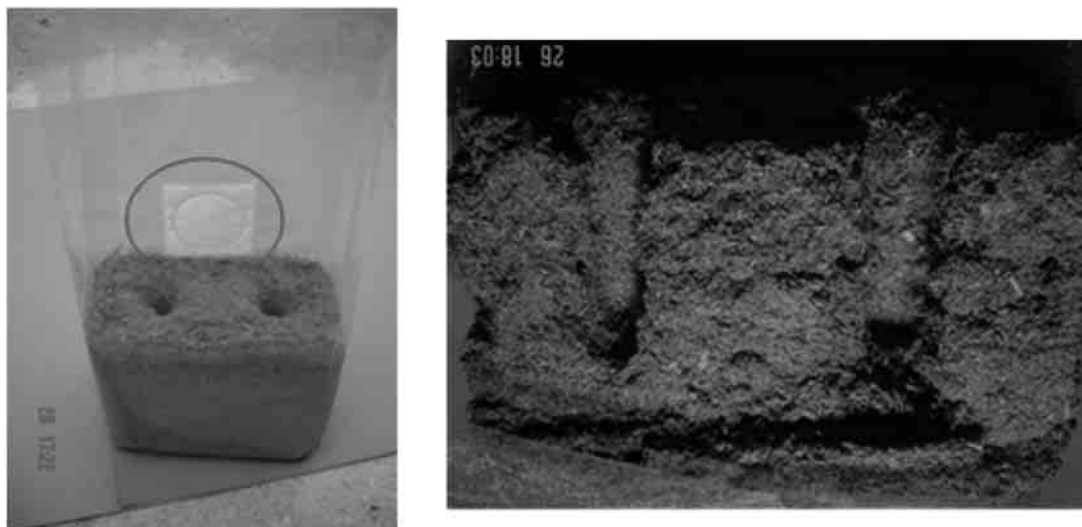


Figura 3: A la izquierda, detalle del filtro y posición en la bolsa de plástico. A la derecha, corte vertical del bloque (detalle de los orificios, donde se añade la semilla).

En el caso del tratamiento por esterilización, se deben mantener temperaturas de 121°C durante aproximadamente 3 horas, mientras que en el caso de la pasteurización, se recomiendan temperaturas de 70 a 98°C durante 12 a 24 horas. Los paquetes se deben colocar espaciados unos de otros dentro del sitio donde se va a hacer el tratamiento (para una mejor distribución del calor y homogeneización) y se deben introducir sondas para la medida de la temperatura en el interior de los paquetes.

INOCULACIÓN

Para la inoculación se debe utilizar obligatoriamente semilla nueva, que sea vigorosa y se encuentre en máxima actividad. Después del tratamiento térmico, y en las máximas condiciones de higiene, se adiciona del 1 al 5% de semilla en relación al peso húmedo del sustrato. En esta fase es importante la adopción de prácticas y medidas que eliminen o minimicen las contaminaciones, que no deben superar el 5%.

Cuando se detecta algún tipo de contaminación, se pueden hacer algunas predicciones, como:

- contaminación superior del sustrato: fallo en la inoculación o en el sellado del plástico post-inoculación.

- contaminación en la base del sustrato: rupturas o fallo en el sellado de la bolsa.
- contaminaciones por todo el sustrato: problemas del tratamiento térmico, formulaciones incorrectas o semilla impura.
- contaminación del interior del bloque hacia el exterior: problemas del tratamiento térmico o semilla contaminada.

DESARROLLO DEL MICELIO Y MADURACIÓN

En locales limpios, dentro de cajas de plástico o estructuras metálicas se deben incubar los paquetes para iniciar el desarrollo del micelio a temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$, elevado nivel de CO_2 (< 3000 ppm) y ausencia de luz. En esta fase el micelio absorbe los nutrientes, los cuales son utilizados en su estructura para la conversión de la energía necesaria para su metabolismo y crecimiento.

De esta manera el Shiitake libera calor, CO_2 y metabolitos secundarios o productos finales tóxicos (oxidación de enzimas polifenoloxidasas) para el propio hongo. Así, en los primeros 30 días, el desarrollo del micelio se produce en cajas de plástico (Figura 4A), donde el sustrato se encuentra en contacto con el líquido generado por su propio metabolismo, a continuación se empieza a hacer las despegaduras (cada 15-20 días) y se separa el sustrato del líquido (Figura 4B), hasta la primera florada (± 100 días) cuando se retira la bolsa plástica.



Figura 4: A – Cámara de incubación, donde los paquetes están dentro de las cajas plásticas durante aproximadamente 30 días, B – Cámara de maduración del micelio, donde en los paquetes el sustrato ya está separado del líquido generado por su propio metabolismo, durante la maduración del micelio cada 15 a 20 días se hace la despegadura.

Podemos destacar entonces que cuando el sustrato esté completamente blanco no significará que se encuentre listo para la producción (inicio de la fructificación), todavía se

debe esperar a su maduración, que ocurre tras el endurecimiento y el oscurecimiento de la capa micelial. Esta protegerá al sustrato de la desecación y las contaminaciones.

Sobre el periodo de desarrollo del micelio y maduración influyen diversos factores, como: variedad utilizada, formulación del sustrato, cantidad de semilla utilizada, temperatura de crecimiento, tasa de CO₂ en los sustratos y en las cámaras de cultivo, cantidad de luz en el ambiente, etc.

PRODUCCIÓN

Después de la formación de la capa micelial se hace la inducción de los carpoforos para la cosecha, donde se maneja la temperatura, la humedad, la luminosidad y el contenido de CO₂ del ambiente de cultivo. Los cambios de las variables ambientales, necesarias para la inducción y cosecha del Shiitake, está descrita en la Tabla 2.

Tabla 2. Características necesarias para el desarrollo y maduración del micelio, y sus respectivos cambios para la fructificación.

Características ambientales	Colonización y maduración del micelio	Inducción y fructificación de los hongos
Temperatura (°C)	± 23°C	± 17°C
Humedad relativa (%)	65 – 75%	70 – 95%
Luminosidad	Ausencia	800 – 2000 lux
Contenido de CO ₂	< 3000 ppm	± 1000 ppm

El cultivo en ambiente climatizado es de fundamental importancia para la conducción de las variables ambientales y una producción estable. De acuerdo con el nivel de tecnificación de las cámaras de cultivo se establece el parámetro con relación a la eliminación del filme plástico (Figura 5); cuanto más tecnificado sea el ambiente mayor podrá ser la superficie de contacto de producción de los paquetes (eliminación total de la bolsa de plástico). Cuando se adopte esta metodología, se sugiere que los bloques sean lavados en agua corriente para la eliminación de los compuestos tóxicos generados por su propio metabolismo, tras lo que se trasladan a unas condiciones ambientales como las recomendadas en la Tabla 2.

Transcurridos entre 8 y 12 días se inician las primeras fructificaciones, las cuales permanecen otros 8 o 10 días de acuerdo con la variedad utilizada. La cosecha se realiza de manera manual retirando el hongo con una leve torsión, debiendo evitarse la presencia de

residuos del pie del Shiitake en los bloques, ya que resultan sustratos adecuados para plagas y enfermedades.



Figura 5. A) Eliminación total de las bolsas de plástico, práctica indicada para cultivos tecnificados, B) eliminación parcial de las bolsas de plástico, práctica indicada para cultivos semi-tecnificados y C) utilización de bolsas de plástico perforadas, práctica indicada para cultivos rústicos.

La productividad varía de acuerdo con el tipo sustrato utilizado, la variedad genética del micelio y las condiciones del ambiente de cultivo. De acuerdo con Oei (2003), ésta se sitúa entre el 15 y el 35% sobre peso húmedo del sustrato. Otros autores han descrito eficiencias biológicas entre 0,6 y 13,5% (Han *et al.*, 1981; Badham, 1988; Rinker, 1991; Levanon *et al.*, 1993; Rossi, 1999).

INTERVALOS ENTRE FLORADAS Y NUEVOS CHOQUES DE INDUCCIÓN

Después de la 1ª florada, es necesario dar un periodo de descanso al hongo. Muchos productores vuelven las características ambientales a las condiciones de incubación o mantienen las mismas condiciones utilizadas para la fructificación.

Este periodo puede variar de 7 a 20 días, transcurridos los cuales se sumergen los bloques en agua durante aproximadamente 12-24 horas para una nueva florada. Este procedimiento se puede repetir otras 2 o 3 veces según la productividad obtenida y las condiciones físicas y biológicas de los bloques.

Para establecer hasta que punto se debe seguir con un cultivo de Shiitake, se han de tener en cuenta las condiciones socio-económicas. La utilización de estructuras rústicas, si se encuentran alejadas de la estructura principal, puede resultar de interés para el traslado del sustrato tras la 3ª florada, con objeto de economizar gastos de energía eléctrica y evitar un aumento de contaminaciones en las salas climatizadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES - No. 1184/09-1), el programa post-grado Energia na Agricultura en la Faculdade de Ciencias Agronômicas (FCA/UNESP, Brasil), la Consejería de Agricultura de Castilla-La Mancha y la Diputación Provincial de Cuenca.

REFERENCIAS

- BADHAM, E. R. (1988). Is autoclaving shiitake substrate necessary? *Mushroom J. Tropics* **8**, 129-136.
- CHANG, S. T. MILES, P.G. (1989). Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 345 pp.
- CHEN, A. W. (2005). What is Shiitake? In: Mushroom Growers` Handbook 2. Mush World, Seoul, Korea. p. 1-11.
- DONOGHUE, J. D., DENISON, W. C. (1995). Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia* **87**(2), 239-244.
- HAN, Y. H., UENG, W. T., CHEN, L. C., CHENG, S. (1981). Physiology and ecology of *Lentinula edodes* (Berk.). *Mushroom Sci.* **11**(2), 623-658.
- KALBERER, P. P. (2000). Influence of urea and ammonium chloride on crop yield and fruit body size of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mushroom Sci.* **15**(1), 361-366.
- LEVANON, D. ROTHSCHILD, N., MASAPHY, S. (1993). Bulk treatment of substrate for the cultivation of Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. *Bioresource Technology* **45**, 63-64.
- MINHONI, M.T.A., ANDRADE, M.C.N., ZIED, D.C., KOPYTOWSKI FILHO, J. (2007). Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – (Shiitake). Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Botucatu, Brasil. 91 pp.
- OEI, P. (2003). Manual on mushroom cultivation: techniques, species and opportunities for commercial application in developing countries. TOOL Publications, Amsterdam. 274 pp.
- RINKER, D. L. (1991). The influence of heat treatment, genotype and other cultural practices on the production of Shiitake mushrooms on sawdust. *Mushromm Sci.* **13**(2), 497-502.
- ROSSI, I. R. (1999). Suplementação de bagaço de cana de açúcar para cultivo axenico do cogumelo Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil. 129 pp.
- ROYSE, D. J., SCHISLER, L. C., DIEHLE, A. (1985). Shiitake mushrooms: consumption, production and cultivation. *Interdisciplinary Science Reviews* **10**, 329-335.

SANT`ANNA, A.(1998). Cultivo do cogumelo Shiitake *Lentinula edodes* (Berk). Pegler em serragem e em toros de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil. 115 pp.

Valorización en agricultura de la materia orgánica procedente del cultivo de champiñón y setas

A. Masaguer¹, J.G. Checa² y M.J. Moya²

¹Departamento de Edafología. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid. E-mail: alberto.masaguer@upm.es.

²Reciclados de Compost de la Mancha, SCL (RECOMSA). Ctra Casasimarro-Quintanar del Rey Km 5. 16239 Casasimarro (Cuenca). E-mail: jgcheca@recomsa.com.

RESUMEN

La gestión de los residuos procedentes del cultivo de champiñón y setas (CAC y PS) presenta una solución desigual en todo el mundo, que varía, fundamentalmente, con la oportunidad de reciclado en sectores próximos a los centros de producción. Las virtudes del subproducto y las limitaciones del mismo requieren establecer la aplicación y dosificación adecuada en los suelos o proponer la mezcla con materiales suplementarios para el uso como sustrato de cultivo. En el presente capítulo se resume la gestión realizada en Castilla-La Mancha por la cooperativa Recomsa y el desarrollo de productos alternativos de valor añadido, que han permitido ofrecer una solución rentable y sostenible a los residuos generados por el sector del champiñón.

Fundamentalmente se presenta la evolución en la generación de los residuos y en la comercialización de productos elaborados con los mismos. Indicando cómo se han desarrollado nuevas aplicaciones, como es la utilización del peletizado, con el fin de poder comercializar productos orgánicos para enmiendas de suelos que no vean comprometido su precio por un sobrecoste debido a los contenidos de humedad y que, por otra parte, faciliten su aplicación con abonadoras convencionales.

Por último se apunta el empleo de CAC como enmienda en suelos contaminados por metales pesados, con la finalidad de inmovilizar los elementos contaminantes e impedir una lixiviación y contaminaciones de acuíferos, al producirse una adsorción de los metales pesados sobre una amplia variedad de grupos funcionales del sustrato orgánico.

INTRODUCCIÓN

Todos los sistemas de producción llevan implícito, en mayor o menor medida, la generación de residuos. Es por ello que la evaluación global del sistema debe contemplar la implantación de modelos cíclicos en los que se minimicen o reincorporen los residuos generados para establecer una gestión sostenible. La gestión integral de los residuos, enmarcada en la Ley 10/1998, contempla de forma prioritaria la reutilización, reciclado y valorización de los residuos sobre otras técnicas de gestión.

El sector del champiñón en España, localizado fundamentalmente en La Rioja y Castilla-La Mancha, genera en torno a las 800.000 t/año de residuo orgánico procedente de

los cultivos de champiñón y otros hongos (Medina *et al.*, 2009). Conscientes de la necesidad de la correcta gestión del subproducto orgánico se han desarrollado trabajos de investigación para la valorización de los materiales (Moya *et al.*, 2001). En primer lugar debe señalarse que no existe una única forma de denominación para los residuos generados. Muchos autores emplean de forma genérica el término Compost Agotado del Champiñón (CAC), aunque otros consideran esta designación con carácter peyorativo, al considerar que algo agotado no presenta propiedades para una valorización. Sin embargo en la bibliografía anglosajona es el término más empleado (Spent Mushroom Substrate, SMS) (Levanon y Danai, 1994; Lohr *et al.*, 1984 y Maher, 1994) y probablemente, si se conocen las propiedades del CAC, se entiende que no se trata de un residuo agotado sino de un producto rico en materia orgánica que puede ser una materia prima interesante para la fabricación de enmiendas y sustratos de cultivo (Morel *et al.*, 2000; López *et al.*, 2006).

CARACTERÍSTICAS INICIALES Y SISTEMA DE GESTIÓN

Con la creación de las instalaciones de Recomsa en la localidad de Quintanar del Rey (Cuenca) en el año 1995 se pone fin a la práctica de depositar los residuos del cultivo en vertederos sin control, eliminando un importante problema ambiental y sanitario. Inicialmente, se trataba de recoger los residuos, almacenarlos temporalmente y transferir el subproducto fresco a terceros. En el año 1999 y en colaboración con el departamento de Edafología de la Universidad Politécnica de Madrid se amplían las instalaciones y se construye una planta de compostaje para la obtención de enmiendas orgánicas y materiales base para la fabricación de sustratos de cultivo. Se aprovecha por lo tanto el potencial del subproducto buscando obtener una mejor valorización de los residuos.

Primeramente se realizó un control analítico de los productos y materias primas de la nueva planta con el objetivo de evaluar las características del residuo de entrada en la planta y proponer un proceso de compostaje para la estabilización de la materia orgánica.

Se reciclan dos materiales de características diferenciadas. El compost procedente del cultivo de champiñón (CAC) y el procedente del cultivo de setas (PS).

Como características más destacadas del CAC citar su aceptable humedad, baja densidad y elevada porosidad. Presenta un pH aceptable como enmienda orgánica, sin embargo el contenido en sales, evaluado por la conductividad eléctrica, es algo elevado debido al empleo de tierras de cobertura ricas en sales y al sulfato de calcio necesario para el cultivo. Sin embargo esta circunstancia ha cambiando en los últimos años debido a que en muchos cultivos se empieza a emplear como capa de cobertura turba, de manera que disminuye de forma importante el contenido en sales. Por otra parte se mejora el contenido en materia orgánica que ya era elevado, destacando su alta riqueza en extracto húmico total y el contenido en N, todo ello hace pensar en un producto con adecuadas propiedades para el compostaje (Masaguer *et al.*, 2000).

Se concluye por tanto, que el empleo del producto fresco (CAC) como materia prima de enmiendas orgánicas permite incrementar el contenido en carbono orgánico de

los suelos y mejorar sus propiedades físicas y nutricionales, además de tener efecto sobre los microorganismos de los suelos incrementando su actividad, lo cual supone una aplicación importante en suelos degradados.

En relación al residuo del cultivo de setas, se trata de un material de menor contenido en sales y menor contenido general de nutrientes, con porosidad muy elevada y alto contenido orgánico. Por todo ello se pueden preparar mezclas de CAC con la incorporación de paja de setas y corteza de pino en la mezcla, además de turba y fibra de coco, con el objetivo de mejorar las propiedades de los subproductos en la fabricación de los sustratos. Se obtienen mezclas con tres componentes (corteza de pino, compost de champiñón y setas) con aceptables condiciones para el empleo como sustratos de cultivo. Si bien deben tener el manejo adecuado a su composición, con un lavado previo de sales, y emplear especies tolerantes a la salinidad (López *et al.*, 2006).

El sistema de gestión, por lo tanto, consiste en una recogida en planta de los subproductos producidos: CAC, PS y plásticos, de forma separada para su mejor valorización. En la planta de tratamiento se acopian los materiales y se proponen las mezclas correspondientes en función del producto final que se pretende elaborar. Es importante un control documentado de las mezclas realizadas que informe de las proporciones, tiempo de compostaje y volteos de las mismas. El control analítico final será la garantía de obtener productos de calidad para el destino final que se proponga.

La planta de compostaje también actúa como centro de transferencia, suministrando a proveedores que emplean a su vez el CAC y PS como materias primas para elaborar sus propios productos. Esta vía es necesaria dado el volumen importante de material a tratar y las dificultades de comercialización de una cantidad elevada de los productos finales.

CONSOLIDACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN

Desde su creación, Recomsa viene gestionando los residuos del sector en Castilla-La Mancha siguiendo un proceso de compostaje controlado, para fabricar enmiendas orgánicas con adecuado contenido en nitrógeno y su equilibrada relación C/N. Esto en ocasiones implica la necesidad de complementar las propiedades del CAC con otros materiales como restos vegetales, orujos de uva y estiércoles. Dichos materiales incorporados a los diferentes procesos de compostaje y con el control de las pilas, tomando datos constantes de temperatura y humedad, han permitido obtener productos de calidad y estables, evitando una mineralización precoz del compost y una pérdida importante de rentabilidad.

Con el fin de conocer el volumen real transformado se presentan en las figuras 1 y 2 la evolución de la entrada de CAC y PS en las plantas de transformación. Se observa como la generación del residuo ha evolucionado en paralelo al mercado de setas y champiñón. La caída de producción y venta de champiñón genera lógicamente disminución del volumen de residuo. Y de igual forma el incremento de la producción de setas y otros hongos,

incrementa la generación del subproducto, aunque lógicamente los volúmenes totales son mucho menores, en torno al 10-15% del CAC.

La incorporación de otros productos al proceso de compostaje supone una mejora de algunos aspectos del producto y además supone una oportunidad de reciclado de otras materias orgánicas. En la figura 3 se presentan los volúmenes de otros productos gestionados por Recomsa, que se ha implantado como gestor de residuos y da un servicio a la zona agropecuaria donde se encuentra. Concretamente se han incorporado orujos de uva, que en los últimos años han sido valorizados como biomasa, gallinazas en cantidades crecientes y restos vegetales que suponen un aporte importante de estructura para el producto final, debido a su contenido en lignina.

La transformación de los residuos en productos se presenta en la figura 4 donde se presentan las cantidades de productos vendidos y su evolución con el tiempo. De forma general los diferentes productos comercializados se pueden concentrar en tres líneas. La primera corresponde a lo denominado abonos, en la que se engloba el producto fresco y las aplicaciones en agricultura. Una segunda línea denominada mantillos hace referencia a la comercialización de productos más elaborados encaminados a la jardinería y paisajismo. Y el último grupo de productos corresponde a los sustratos de cultivo indicados para producción de planta en contenedor. Las dos últimas referencias se comercializan en volumen.

Se observan unas oscilaciones importantes en la comercialización que corresponden con la evolución propia del mercado y la afectación marcada que está teniendo el sector jardinería por la situación económica. La comercialización de abonos se ha mantenido en prácticamente 12.000 t/año, mientras que la comercialización de sustratos con una evolución creciente se ha visto afectada por la situación económica pero tiene un importante potencial en el futuro. Mención aparte requiere la comercialización del denominado mantillo, este producto con una salida media de 15.000 m³/año desde 2004 a 2008 ha sido prácticamente sustituido por un nuevo producto que es la enmienda orgánica peletizada, fruto de un sistema de innovación tecnológico.

APLICACIONES Y PROPIEDADES DESTACADAS

Con el objetivo de realizar una valorización adecuada de los subproductos del cultivo de champiñón y setas se ha desarrollado una serie de productos que han tratado de llegar al mercado tras un estudio previo de sus características para recomendar las aplicaciones correctas en la agricultura, jardinería y paisajismo. No cabe duda que la aplicación más inmediata es la venta del subproducto directo a empresas fabricantes de abonos y sustratos. Sin embargo Recomsa elabora, de forma creciente, sus propios productos destinados a diferentes sectores.

Al sector vitivinícola se destina el Abonovid, un abono orgánico destinado a los cultivos extensivos, particularmente la vid, con elevado contenido orgánico y con capacidad para aumentar la disponibilidad de oligoelementos para el cultivo. La aceptación

de este producto se ha incrementado con una nueva formulación enriquecida que, con base de CAC incorpora estiércoles compostados y restos vegetales compostados. Además como se ha mencionado, a través del peletizado se está comercializando un producto de gran interés denominado Agrifem®Soil.

El Agrifem®Soil es una enmienda orgánica húmica, con un 17% de extracto húmico total, que debido a su reducida humedad (14%) permite reducir costes de transporte y hace más cómoda su aplicación.

Como característica destacada del CAC cabe señalar, que a pesar de tratarse de un residuo presenta niveles muy reducidos de metales pesados (Tabla 1). Según el RD 824/2005 puede clasificarse como clase B, debido a la concentración de níquel. El Ni no es un elemento considerado todavía como esencial, aunque se han descrito efectos beneficiosos de su presencia en suelos, también se han descrito toxicidades en suelos derivados de rocas ultra básicas (Wild, 1992). La concentración media de níquel en los suelos españoles es de 20,85 mg/kg, y en el 90% de la superficie de España dedicada a uso agrícola, el valor está por debajo de 35 mg/kg (Rodríguez *et al.*, 2009). En relación al resto de los metales pesados se podría clasificar el CAC como compost clase A debido a los valores que se presentan en la tabla 1.

También es de destacar el empleo del CAC como componente de sustratos alternativos a sustratos no renovables como la turba y en especial al efecto de supresividad natural de estos compost frente a enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*. Se ha demostrado que los mecanismos asociados a los fenómenos de supresividad son distintos (supresividad general/supresividad específica) dependiendo del tipo de compost y patógeno, atribuyéndose a distintas comunidades microbianas, disponibilidad de determinados nutrientes y pH (Trillas *et al.*, 2008).

EMPLEO DE CAC EN LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

El desarrollo de fertilizantes químicos y el encarecimiento de las enmiendas orgánicas redujeron durante mucho tiempo el empleo de estas últimas, hasta que actualmente la introducción de conceptos como agricultura sostenible o agricultura ecológica, han aumentado de nuevo la demanda de mejoradores de suelos. Además el incremento del precio de los fertilizantes de síntesis y el convencimiento general de mejorar las propiedades físicas del suelo frente a la erosión ha despertado cierto interés por la fertilización orgánica. En el estado de Pensylvania (EEUU) la valorización del CAC es ya una tradición. Así, en el periodo de 1990-91 ya se aplicaban más de 550.000 t/año, destinando un 20% a su reciclado dentro del propio cultivo de champiñón, otro 20% como enmienda orgánica y abono de cultivos, el 25 % se empleó en horticultura y jardinería y el 20% restante para recuperación de suelos (Maher, 1994).

El CAC posee, en principio, un gran potencial en el tratamiento in situ de suelos contaminados y ofrece una atractiva tecnología para la descontaminación de suelos en los que existan residuos tóxicos y peligrosos. La variedad y cantidad de moléculas orgánicas

que posee ofrecen un amplio abanico de procesos de retención y degradación de compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos (Frutos, 2009).

Chen *et al.* (2005) comprobaron la gran capacidad del CAC para retener metales pesados, utilizándolo como filtro para purificar aguas contaminadas. En estas condiciones encontraron que un gramo de CAC podía retener hasta 833 mg de Cd, 1000 mg de Pb y 44 mg de Cr. Determinaron que a mayor pH, mayor es la retención de los metales, y propusieron a los grupos carboxílicos, fenólicos y fosforilos como los principales responsables del proceso.

Por su parte Frutos (2009) presenta conclusiones sobre una línea de investigación abierta en la Universidad Autónoma de Madrid en colaboración con la Universidad Politécnica de Madrid donde se caracterizaron estos aspectos del CAC como recuperador de suelos. En resumen se concluye que el CAC es un residuo orgánico abundante de precio razonable, utilizable en la recuperación de suelos de minas. Su aplicación disminuiría notablemente la lixiviación de metales pesados, evitando así la extensión de la contaminación hacia aguas subterráneas. Además, su aporte de nutrientes y materia orgánica, facilitaría el mantenimiento de una cubierta vegetal, algo fundamental para la regeneración del ecosistema.

AGRADECIMIENTOS

Las actividades necesarias para la realización de este trabajo han sido financiadas por los proyectos: Plan Nacional de Investigación (Ministerio de Educación y Ciencia CTM 2005-06258-C02) y Aplicación de pellet de compost vegetal y compost procedente de cultivo de champiñón como enmienda orgánica de suelos (RECOMSA-UPM).

BIBLIOGRAFÍA

CHEN G.G., ZENG G.M., TU X., HUANG G.H., CHEN Y.N. (2005). A novel biosorbent: characterization of the spent mushroom compost and its application for removal of heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* **17**: 756-760.

FRUTOS I. (2009). Evaluación del CAC (Compost Agotado de Cultivo de champiñón) como enmienda recuperadora de suelos ácidos de mina contaminados con metales pesados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 211 pp.

LEVANON D., DANAI O. (1994). Chemical, physical and microbiological considerations in recycling spent mushroom substrate. En: Environmental, Agricultural and industrial uses for Spent Mushroom Substrate from mushroom farms. American Mushroom Institute. Pennsylvania.

LOHR V.I., WANG S.H., WOLT J.D. (1984). Physical and Chemical characteristics of fresh and aged Spent Mushroom Compost. *HortScience* **19**(5):681-683.

- LÓPEZ, M.C., RUIZ-FERNÁNDEZ J., MASAGUER A. (2006). Producción de planta ornamental en contenedor con sustratos alternativos a la turba. IMIDRA. Comunidad de Madrid. 173pp.
- MAHER M.J. (1994). The use of spent mushroom substrate (SMS) as an organic Manure and plant substrate component. En: Environmental, Agricultural and industrial uses for Spent Mushroom Substrate from mushroom farms. American Mushroom Institute. Pennsylvania.
- MASAGUER A., BENITO M; DE DIEGO I, DE ANTONIO R. (2000). Fabricación de enmiendas y sustratos de cultivo a partir del compost utilizado en el cultivo del champiñón y las setas. Jornadas sobre tratamientos biológicos de residuos orgánicos. Logroño. La Rioja.
- MEDINA E., PAREDES C., PÉREZ-MURCIA M.D., BUSTAMANTE., M.A. MORAL R. (2009). Spent mushroom substrates as component of growing media for germination and growth of horticultural plants. *Bioresource Technology* **100**: 4227-4232.
- MOREL L., PONCET L., RIVIÈRE L.M. (2000). Les supports de culture horticoles. INRA Editions. Paris. 87 pp.
- RODRÍGUEZ MARTÍN J.A., LÓPEZ ARIAS M., GRAU J.M. (2009). Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de los suelos agrícolas y pastos de España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid. 225 pp.
- TRILLAS M.I., SANT D., CARMONA E., ORDOVÁS J., AVILÉS M. (2009). Supresividad natural en sustratos formulados a base de compost. *Actas de Horticultura* **53**: 32-41.
- WILD A. (1992). Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 1045 pp.

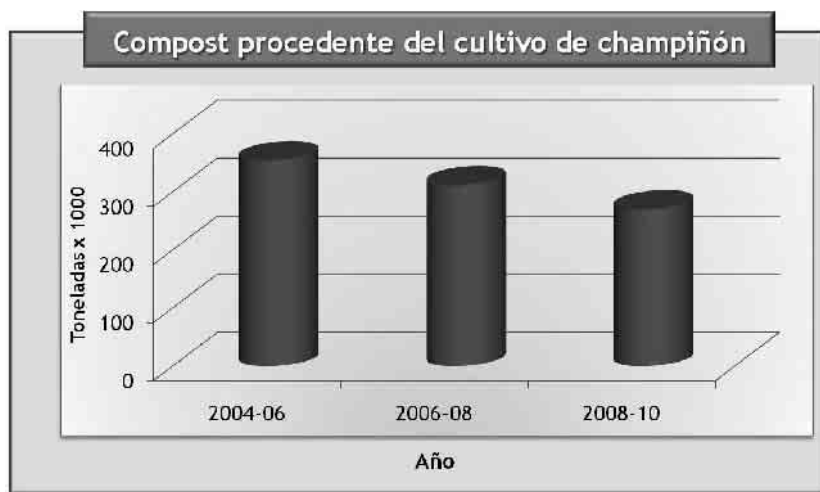


Figura 1. Evolución del compost de champiñón gestionado de 2004 a 2010 (t/2 años).

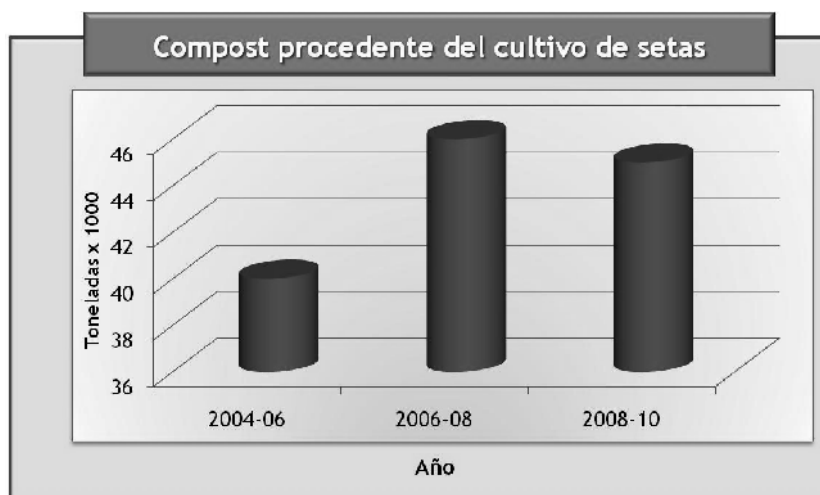


Figura 2. Evolución del sustrato del cultivo de setas gestionado de 2004 a 2010 (t/2 años).

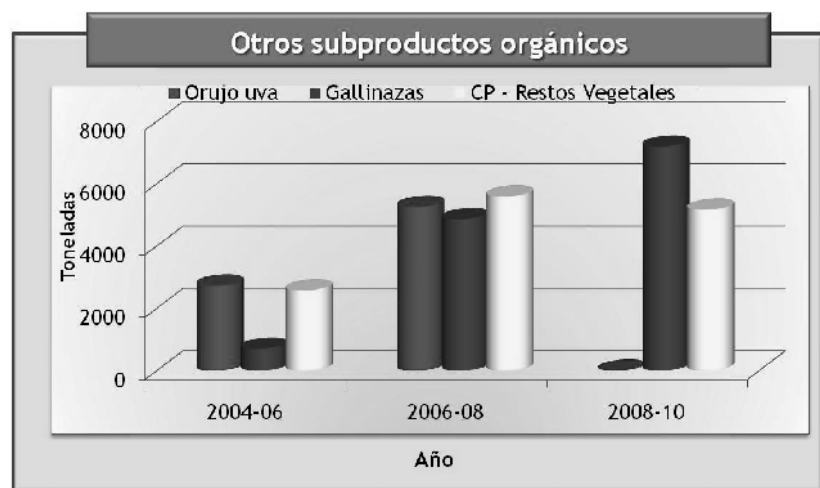


Figura 3. Cantidades recicladas de otros residuos orgánicos de 2004 a 2010 (t/2 años).

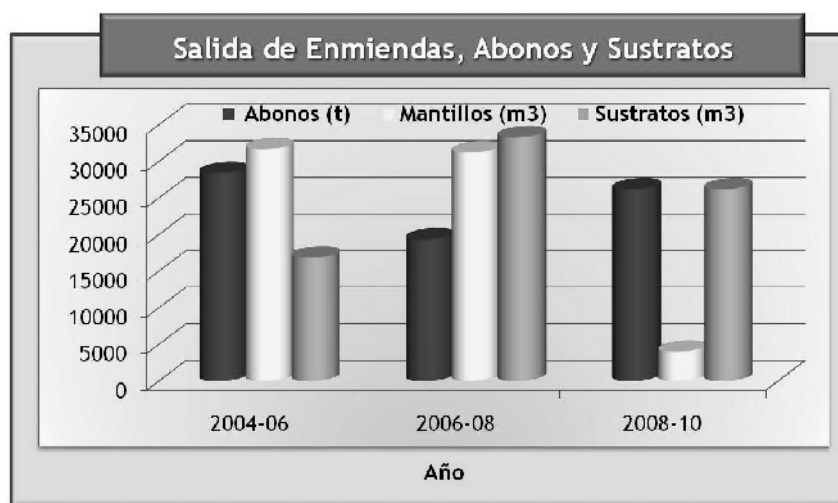


Figura 4. Ventas de enmiendas, abonos y sustratos de 2004 a 2010 (t/2 años).

Tabla 1. Clasificación del CAC según la legislación española de fertilizantes (RD 824/2005).

Metal Pesado	Límites de concentración (Sólidos: mg/kg s.m.s)			
	Líquidos: mg/kg			
	CLASE A	CAC	CLASE B	CLASE C
Cadmio	0,7	0,1	2	3
Cobre	70	16,8	300	400
Níquel	25	30,4	90	100
Plomo	45	6,2	150	200
Zinc	200	141,0	500	1.000
Mercurio	0,4	lp	1,5	2,5
Cromo (total)	70	18,7	250	300
Cromo (VI)	0	0	0	0

Fotografías sobre el proceso de valorización de los subproductos del cultivo de champiñón y setas en Recomsa SCL



Foto 1. Recepción del residuo, separado el plástico y la materia orgánica.



Foto 2. Realizadas y ajustadas las mezclas, el material se voltea para airear y homogeneizar el compost.

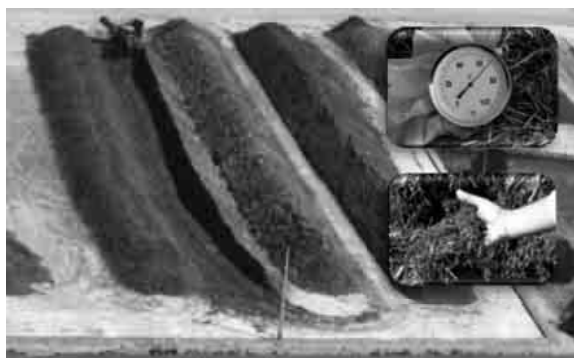


Foto 3. Durante el compostaje, en pilas abiertas de gran tamaño, se controlan la temperatura y parámetros físico-químicos.



Foto 4. Finalizado el compostaje el producto se criba para retirar tamaños impropios.



Foto 5. El producto compostado y estabilizado, con la humedad ajustada, se peletiza para compactarlo y formar el gránulo de pelet.



Foto 6. Finalmente el producto peletizado se comercializa para su aplicación en agricultura, jardinería y paisajismo.

Reutilización de sustratos post-cultivo de hongos comestibles en nuevos ciclos de producción

A. Pardo-Giménez¹, M^a. R. Picornell Buendía², A. de Juan Valero² y J.E. Pardo-González²

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), C/ Peñicas, s/n, Apartado 63. 16220 Quintanar del Rey, Cuenca, España.

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario, s/n. 02070 Albacete, España.

INTRODUCCIÓN

Las actuales aplicaciones de los sustratos degradados durante el cultivo de hongos comestibles, principalmente como componente de enmiendas y sustratos de cultivo, no son siempre suficientes para dar salida al elevado volumen de material generado año tras año, que se acumula ocasionalmente en los centros de recogida situados en las zonas productoras y que constituye un contaminante potencial. El sector productor genera, en España, más de 5 10⁵ toneladas de residuos de estos sustratos tras el cultivo comercial, mientras que el conjunto de la UE produce más de 3,5 10⁶ toneladas.

En un trabajo de Rinker (2002) se presenta una recopilación de los posibles usos que pueden tener los sustratos post-cultivo de hongos comestibles, haciendo referencia a su empleo en biorremediación (purificación de aire, agua, suelos y sustratos contaminados con plaguicidas), utilización en otros cultivos (flores y hortalizas en invernadero, frutas y hortalizas en campo, otros cultivos), enmienda general de suelos, semilleros y paisajismo, alimentación animal y acuicultura, control de plagas y enfermedades y usos diversos (combustible, vermicultura, otros), considerando también su reutilización en el cultivo de hongos, como material de cobertura para *Agaricus* spp. y como sustrato para el cultivo de otras especies. En cuanto a su utilización en la preparación de sustratos de cobertura, en un reciente trabajo de Pardo (2008) se describen aspectos como la evolución histórica y distribución geográfica del empleo de estos materiales, las formulaciones utilizadas y los tratamientos aplicados, a la vez que se discuten los diferentes factores que pueden influir sobre el comportamiento agronómico, entre los que encontramos el material de origen, el tratamiento térmico con vapor previo al vaciado del local, las condiciones de compostaje/ maduración/ biotransformación, el lavado artificial, la molienda y/o cribado, el tratamiento final (térmico/ químico), las mezclas con otros materiales y proporciones y el manejo del cultivo. Por otro lado, existen referencias acerca de la utilización de diferentes sustratos post-cultivo en la producción de distintas especies de hongos comestibles, entre otras, de los géneros *Agaricus*, *Auricularia*, *Lentinula*, *Pleurotus* y *Volvariella* (Pardo, 2008). En concreto, para la producción de *Pleurotus* spp. existen referencias de la utilización de sustratos post-cultivo de *Agaricus* spp. (Mueller *et al.*, 1984; Sharma y Jandaik, 1994), *Pleurotus* spp. (Sharma y Jandaik, 1985, citado por Quimio *et al.*, 1990; Sharma y Jandaik, 1992; Nakaya *et al.*, 2000), *Lentinula edodes* (Royse, 1992; Royse, 1993; Jaramillo, 2001, com. pers. citado por Rinker, 2002) y *Volvariella* (Quimio, 1988 citada por Oei,

1991,1996, Royse, 1993 y Quimio *et al.*, 1990; Chang y Miles, 1989; Quimio *et al.*, 1990). Junto a lo anteriormente expuesto, se debe tener en cuenta que uno de los principales problemas a resolver en una gestión eficaz del medio ambiente es minimizar la producción de residuos o reincorporarlo a la cadena de producción, tomando como prioridad frente a otras técnicas de gestión la reutilización, reciclado y valorización de los residuos.

El Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, en colaboración con el Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria de la Universidad de Castilla-La Mancha, ha llevado a cabo un proyecto de investigación bajo el título “Reutilización del compost agotado en la producción de hongos comestibles cultivados”, cuyo objetivo es la valorización de los sustratos post-cultivo de hongos comestibles mediante su reintroducción en nuevos ciclos de producción. Se trata de un proyecto enmarcado en el Subprograma Nacional de Recursos y Tecnologías Agrarias en Coordinación con las Comunidades Autónomas, cofinanciado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y el programa EU FEDER (proyecto RTA2006-00013-00-00). El proyecto propone la caracterización y tratamiento de los sustratos post-cultivo de champiñón y setas para su reincorporación en la elaboración de sustratos de cobertura en cultivo de *Agaricus* spp. y en la elaboración de sustratos de base para el cultivo de *Pleurotus* spp., principales hongos comestibles cultivados actualmente en España, así como la evaluación agronómica en salas de cultivo de los materiales obtenidos. El proyecto se planteó con objeto de aportar al sector profesional tecnología para la transformación de los sustratos degradados, adaptándolos a los requerimientos del cultivo de otros hongos cultivados a partir de dos áreas de trabajo principales:

1. Desarrollo y evaluación de mezclas de cobertura estandarizadas que faciliten el manejo del cultivo de champiñón y aumenten la regularidad de las producciones.
2. Desarrollo y evaluación de nuevas formulaciones y tecnología para la elaboración de sustratos para el cultivo de setas del género *Pleurotus*.

El desarrollo de las nuevas formulaciones y metodologías para la elaboración de sustratos obtenidas durante la ejecución del proyecto puede suponer para el sector productor, a corto plazo, un abaratamiento de los costes de producción al tener en consideración el empleo de materiales autóctonos de escaso o nulo valor económico, fácilmente disponibles y, a la vez, disminuir el impacto ambiental que supone la acumulación de este tipo de sustratos en los centros de recogida. Se presentan a continuación algunos de los principales resultados derivados de la ejecución del proyecto en las dos áreas de trabajo consideradas.

ÁREA DE COBERTURAS PARA CULTIVO DE *Agaricus* spp.

El trabajo en el área de las coberturas surge como continuación de un proyecto internacional anterior sobre valorización de los sustratos postcultivo de champiñón en el que participaron, entre otros, el CIES y Recomsa, S.C.L. (proyecto EU-CRAFT QLK5-CT-2002-71056).

En la Figura 1 se presenta de manera esquemática el trabajo desarrollado en el área de coberturas para cultivo de *Agaricus* spp. elaboradas a partir de sustratos post-cultivo de champiñón (SPC).

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a ensayos de evaluación agronómica de mezclas de cobertura llevados a cabo en cámara visitable, utilizando composts comerciales y micelios híbrido blanco liso. En cada experimento, la conducción del ciclo de cultivo se llevó a cabo en las condiciones de humedad, temperaturas y concentración de dióxido de carbono recomendadas para la variedad comercial de micelio utilizada. Los testigos empleados en los primeros tres experimentos fueron una mezcla de suelo mineral y fibra de coco en proporción 4:1 (v/v), y una mezcla de turba rubia y carbonato cálcico precipitado de azucarera, en proporción 2:1 (v/v). En el cuarto experimento se utilizaron además como testigo dos coberturas comerciales (Topterra y Torreblanca).

En todos los experimentos se utilizó un diseño de bloques al azar con seis repeticiones. Los seis bloques, correspondientes a las repeticiones, se colocaron en tres niveles, a ambos lados de la cámara de cultivo. Se utilizó un número variable de cubetas según experimento, cada una de las cuales se llenó con 6 kg de compost, compactado a razón de 450 kg m^{-3} , presentando una superficie a cubrir de 870 cm^2 (peso de llenado $69,0 \text{ kg m}^{-2}$). En todos los casos, el SPC utilizado fue sometido a un tratamiento térmico (70°C , 12h) previo al vaciado de la sala de cultivo, y a un posterior madurado durante dos meses, de acuerdo con el método descrito por Lohr et al. (1984). El espesor de cobertura empleado fue de 3 cm en todos los casos.

En la tabla 1 se muestran los principales parámetros de producción registrados con coberturas basadas en SPC sometido a diferentes niveles de lavado. Se establecieron 5 niveles (0, 1, 2, 3 y 4), según los volúmenes de agua empleados por volumen de sustrato. A estas mezclas elaboradas con SPC se les añadió carbonato cálcico precipitado a razón de 100 g L^{-1} . Como aspectos destacables aparece el hecho del que el empleo del SPC no lavado supone, de manera significativa, el peor comportamiento en cuanto al rendimiento, consecuencia de su alta conductividad eléctrica. Aunque inferiores a los testigos, todas las coberturas basadas en SPC sometido a los diferentes niveles de lavado presentaron valores aceptables de eficiencia biológica (entre $96,1$ y $105,6 \text{ kg } 100\text{kg}^{-1}$ compost); además, los champiñones producidos fueron de mayor tamaño y mayor contenido en materia seca que los obtenidos con las coberturas utilizadas como referencia. En el trabajo de Pardo *et al.* (2008) se presenta de manera detallada los resultados de este experimento.

En la tabla 2 se muestran los principales parámetros de producción registrados con coberturas basadas en mezclas de SPC con turba rubia en diferentes proporciones, a las que se añadió carbonato cálcico precipitado a razón de 100 g L^{-1} . En este caso, resulta de interés destacar el hecho de que coberturas conteniendo hasta un 60% en volumen de SPC proporcionan valores de eficiencia biológica superiores a $100 \text{ kg } 100\text{kg}^{-1}$ compost, sin diferir de manera significativa con los testigos. Se observa asimismo como al aumentar la proporción de SPC en la mezcla aumenta el contenido en materia seca de los champiñones

cosechados, consecuencia de una fructificación menor asociada a valores crecientes de la conductividad eléctrica y decrecientes de la porosidad.

Un experimento similar al anterior, en el que se utilizó fibra de coco en lugar de turba rubia proporcionó los resultados que se presentan en la tabla 3. En este caso se observa una disminución gradual del rendimiento al aumentar la proporción de SPC en la mezcla de cobertura, a la vez que aumenta el contenido en materia seca de los champiñones producidos, al igual que sucedía en el experimento anterior. La eficiencia biológica proporcionada por la cobertura basada en fibra de coco y SPC en proporción 4:1, (v/v) fue de 92,9 kg 100kg⁻¹ compost, situándose entre la proporcionada por los dos testigos utilizados, igual que sucede para el diámetro (33,3 mm) y la materia seca (7,71 g kg⁻¹). Los resultados de este experimento se presentan de manera detallada en el trabajo de Pardo y Pardo (2008).

En la tabla 4 se muestran los resultados de un cuarto experimento en el que se ensayaron, junto a cuatro testigos, coberturas basadas en SPC que mostraron un buen comportamiento en experimentos anteriores. Como aspectos destacables encontramos los altos valores de eficiencia biológica registrados, que llegan hasta los 100 kg kg⁻¹ compost, similares a los proporcionados por los testigos, y los altos valores relativos observados, con respecto a los mismos, en el contenido en materia seca de los carpóforos cosechados con algunas de las nuevas coberturas elaboradas. Los resultados del traslado a formato comercial de algunas de las coberturas ensayadas anteriormente han sido publicados recientemente por Pardo y Pardo (2009b).

La conductividad eléctrica se confirma como el factor determinante en el comportamiento agronómico de la capa de cobertura cuando se utiliza SPC como ingrediente. Los resultados obtenidos muestran la viabilidad de la reintroducción del sustrato en nuevos ciclos de cultivo, ya sea como material de base único, si se somete a un proceso de lavado para eliminar sales solubles, o bien mezclado con otros materiales de baja conductividad como es el caso de la turba rubia o la fibra de coco. Esta reutilización del SPC constituye una alternativa interesante a considerar en la producción comercial, con vistas a reemplazar a las tierras y a los sustratos orgánicos utilizados habitualmente, lo que resulta de gran interés si se tienen en cuenta aspectos como la problemática asociada al empleo de turba, principalmente por agotamiento de reservas y alteración de ecosistemas y el volumen de material de cobertura que demanda anualmente el sector productor (estimado en 1,5 10⁵ m³ anuales en España), presentando la doble ventaja de disminuir los costes de elaboración y el impacto ambiental.

ÁREA DE SUSTRATOS PARA CULTIVO DE *Pleurotus* spp.

En el área de sustratos para cultivo de *Pleurotus* spp. se parte de trabajos preliminares llevados a cabo en el CIES por parte de D. José Pardo, partiendo de la base de que, en muchos casos, buena parte del potencial productivo de los sustratos queda en los mismos al finalizar los ciclos de cultivo, quedando con frecuencia la sensación de que los sustratos podrían haber resultado más productivos.

En la Figura 2 se presenta de manera esquemática el trabajo desarrollado en el área de sustratos para cultivo de *Pleurotus* spp. elaborados a partir de sustratos post-cultivo de champiñón (SPC) y setas (SPP).

Los resultados que se describen a continuación corresponden a ensayos de evaluación agronómica de sustratos para cultivo de setas llevados a cabo en túnel invernadero, utilizando sustratos comerciales como testigos. En los diferentes experimentos, la conducción del ciclo de cultivo se llevó a cabo en las condiciones de humedad, temperaturas, concentración de dióxido de carbono e iluminación recomendadas para la variedad comercial de micelio utilizada. Al elaborar los sustratos, los materiales fueron mezclados y humectados tras lo cual se sometieron a un tratamiento térmico de pasteurización (65-70 °C, 8 h) y progresivo descenso en 15 h a temperatura de siembra (25 °C). Finalizados los tratamientos, los sustratos fueron inoculados utilizando una dosis de siembra del 30 g kg⁻¹. Por último se procedió al ensacado, empleando para ello sacos perforados transparentes de polietileno, con capacidad para 6 kg de sustrato, a los que se practicaron 4 orificios de 22 mm de diámetro distribuidos uniformemente en la superficie lateral de cada saco. En todos los experimentos se utilizó un diseño de bloques al azar con seis repeticiones.

En cuanto a los resultados obtenidos, al evaluar sustratos basados en combinaciones de SPP y SPC (a los que se adicionaron 50 g kg⁻¹ de CaSO₄), proporciones 9:1 y 8:2 (p/p) han proporcionado, respectivamente, eficiencias biológicas de 36,0 y 39,7 kg/100 kg sustrato, sin diferencias significativas con el sustrato comercial utilizado como testigo. Las setas producidas con estos sustratos presentan mayor contenido en materia seca que las producidas por el sustrato comercial, aunque son de menor tamaño y presentan bajos contenidos en proteína (tabla 5).

La aplicación de suplementos nutritivos comerciales, ampliamente estudiados en cultivo de champiñón, pueden resultar de interés para servir como suplemento a sustratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* basados en SPP, como puede observarse en la tabla 6. Partiendo de una mezcla 1:1 de paja y SPP (p/p) como material de base, utilizando como aditivos CaSO₄ (50 g kg⁻¹) y CaCO₃ (10 g kg⁻¹), la aplicación de suplementos nutritivos comerciales a razón de 20 g kg⁻¹, ha supuesto incrementos notables de la producción sobre el sustrato no suplementado, con eficiencias biológicas que no difieren significativamente del testigo comercial, alcanzando valores de 48,93 kg/100 kg sustrato cuando se utilizó Calprozime® como suplemento. Aunque de manera no significativa, las setas obtenidas de los sustratos suplementados han presentado mayores contenidos en materia seca que las del sustrato comercial y el sustrato no suplementado. El buen comportamiento del Calprozime® a dosis de 20 g kg⁻¹ y, en menor medida, de 10 g kg⁻¹, había sido previamente constatado en ensayos anteriores (Pardo *et al.*, 2009).

Se puede obtener información complementaria sobre parte del trabajo realizado sobre la reutilización del SPC en nuevos ciclos de cultivo de *Pleurotus* spp. en las publicaciones de Picornell *et al.* (2009), Pardo y Pardo (2009a) y Pardo *et al.* (2009). Al igual que sucedía en el caso de las coberturas, este tipo de materiales puede, en principio, ser integrado por medio de nuevas formulaciones y metodologías con la doble ventaja del

abaratamiento de los costes de producción, limitando la dependencia de la paja, y la disminución del impacto ambiental, reincorporando los materiales a la cadena de producción.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto RTA2006-00013-00-00 financiado por el INIA y FEDER.

REFERENCIAS

- CHANG, S.T., MILES, P.G. (1989). *Edible Mushrooms and their Cultivation*, 345 pp. CRC Press, Florida, USA.
- LOHR, V.I., WANG, S.H., WOLT, J.D. (1984). Physical and chemical characteristics of fresh and aged spent mushroom compost. *HortScience* **19**(5): 681-683.
- MUELLER, J.C., GAWLEY, J.R., HAYES, W.A. (1984). Utilization of spent alder compost as a substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *Mushroom News for the Tropics* **5**(2): 3-7.
- NAYAKA, M., YONEYAMA, S., KATO, Y., HARADA, A. (2000). Recycling of cultural waste of *Pleurotus cornucopiae* for cultivation of *P. cornucopiae* and *P. ostreatus*. <http://www.agro.nl/pc/isms/posters/pos169.htm> (16-Agosto-2000).
- OEI, P. (1991). Environmental care: an integrated approach, pp. 43-46. En: *Manual on Mushroom Cultivation*, 249 pp. TOOL Publications-CTA. Amsterdam-Wageningen, The Netherlands.
- OEI, P. (1996). Environmental care: an integrated approach, pp. 38-43. En: *Mushroom Cultivation*, 274 pp. TOOL Publications. Leiden, The Netherlands.
- PARDO, A. (2008). Reutilización del sustrato agotado en la producción de hongos comestibles cultivados. *ITEA Producción Vegetal* **104**(3): 360-368.
- PARDO, A., PARDO, J.E. (2008). Evaluation of casing materials made from spent mushroom substrate and coconut fibre pith for use in production of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**(4): 683-690.
- PARDO, A., PARDO, J.E., GARVÍ, A.M. (2008). Evaluación de sustratos de cobertura, elaborados a partir de compost agotado, en la producción de *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Cuadernos de Fitopatología* **95**: 5-13.
- PARDO-GIMÉNEZ, A., PARDO-GONZÁLEZ, J.E. (2009a). Elaboración de nuevos sustratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. basados en sustratos degradados por el cultivo de hongos. *ITEA Producción Vegetal* **105**(2): 89-98.
- PARDO-GIMÉNEZ, A., PARDO-GONZÁLEZ, J.E. (2009b). Evaluación de coberturas basadas en sustratos postcultivo de champiñón en nuevos ciclos de cultivo. *Cuadernos de Fitopatología* **101**, 13-19.
- PARDO-GIMÉNEZ, G., PARDO-GONZÁLEZ, J.E., PICORNELL BUENDÍA, M.R., DE JUAN VALERO, J.A. (2009). Suplementación de sustratos degradados por el cultivo de *Pleurotus ostreatus* para su utilización en nuevos ciclos de cultivo. *Actas de Horticultura* **54**: 670-674.

- PICORNELL BUENDÍA, M.R., DE JUAN VALERO, J.A, PARDO-GONZÁLEZ, J.E., PARDO-GIMÉNEZ, A. (2009). Utilización de sustratos post-cultivo de hongos comestibles en la producción de *Pleurotus ostreatus*. *Actas de Horticultura* **54** resúmenes, 289-290.
- QUIMIO, T.H. (1988). Continuous recycling of rice straw in mushroom cultivation for animal feed. En: ST Chang, K Chan, NYS Woo (Eds.). *Recent Advances in Biotechnology and Applied Microbiology*. Chinese University Press, Hongkong.
- QUIMIO, T.H., CHANG, S.T., ROYSE, D.J. (1990). *Technical Guidelines for Mushroom Growing in the Tropics*. FAO Plant Production and Protection Paper 106. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- RINKER, D.L. (2002). Handling and using “spent” mushroom substrate around the world, pp. 43-60. En: JE Sánchez, G Huerta, E Montiel. (Eds.). *Mushroom Biology and Mushroom Products*, 468 pp. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México.
- ROYSE, D.J. (1992). Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 179-182.
- ROYSE, D.J. (1993). Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). *Mushroom News* **41**(2): 14-20.
- SHARMA, V.P., JANDAİK, C.L. (1985). Studies on recycling of *Pleurotus* waste. *Mushroom Journal for the Tropics* **6**(2): 13-15.
- SHARMA, V.P., JANDAİK, C.L. (1992). Recycling of mushroom industry waste for growing *Pleurotus sajor-caju* and *Auricularia polytricha*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* **22**(2): 182-186.
- SHARMA, V.P., JANDAİK, C.L. (1994). Recycling of spent compost for growing *Auricularia polytricha* and *Pleurotus* species. *Mushroom Information* **10/11**: 15-20.

Figura 1. Planteamiento esquemático del trabajo en el área de coberturas para cultivo de *Agaricus* spp.

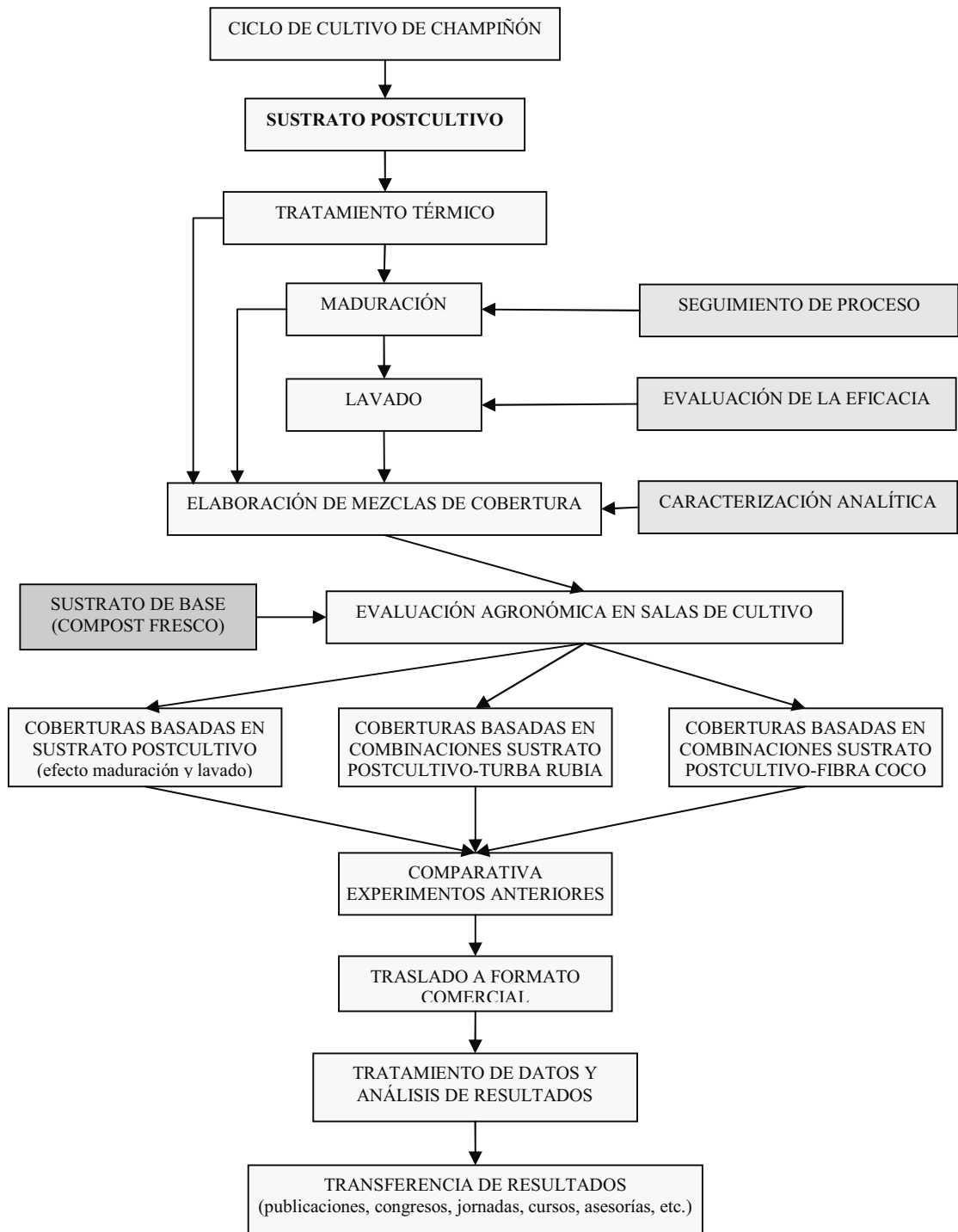


Tabla 1. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación de coberturas basadas en sustratos postcultivo de champiñón sometido a diferentes niveles de lavado (micelio Fungisem H-25).

COBERTURA	RENDIMIENTO (kg m ⁻²)	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹)	DIÁMETRO DEL CARPÓFORO	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)
1 TESTIGO SM+FC	24,92 ab	116,2 ab	30,7 bc	73,8 d
2 TESTIGO TR+CCPA	25,42 a	118,5 a	28,9 c	77,6 cd
3 SPC L0	14,58 d	68,0 d	40,0 a	112,3 a
4 SPC L1	22,00 bc	102,6 bc	31,8 b	86,0 b
5 SPC L2	20,61 c	96,1 c	32,3 b	87,4 b
6 SPC L3	22,36 bc	104,3 bc	32,2 b	84,7 b
7 SPC L4	22,66 abc	105,6 abc	32,3 b	82,0 bc
MEDIA	21,79	101,6	32,6	86,2

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). SM: suelo mineral; FC: fibra de coco; TR: turba rubia; CCPA: carbonato cálcico precipitado de azucarera; SPC: sustrato postcultivo de champiñón; L: nivel de lavado

Tabla 2. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación de coberturas basadas en mezclas de sustratos postcultivo de champiñón y turba rubia (micelio Fungisem H-25).

COBERTURA	RENDIMIENTO (kg m ⁻²)	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹)	DIÁMETRO DEL CARPÓFORO	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)
1 TESTIGO SM+FC	26,30 a	114,9 a	35,7 b	7,67 cd
2 TESTIGO TR+CCPA	24,25 ab	105,9 ab	31,0 c	8,08 bcd
3 TR-SPC 5:0	22,84 b	99,7 b	32,7 bc	7,50 d
4 TR-SPC 4:1	25,20 ab	110,1 ab	31,2 c	7,27 d
5 TR-SPC 3:2	24,18 ab	105,6 ab	30,5 c	8,02 cd
6 TR-SPC 2:3	23,25 ab	101,6 ab	31,0 c	8,51 bc
7 TR-SPC 1:4	19,42 c	84,8 c	35,3 b	8,99 b
8 TR-SPC 0:5	12,11 d	52,9 d	47,3 a	11,22 a
MEDIA	22,19	96,9	34,3	8,41

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). SM: suelo mineral; FC: fibra de coco; TR: turba rubia; CCPA: carbonato cálcico precipitado de azucarera; SPC: sustrato postcultivo de champiñón

Tabla 3. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación de coberturas basadas en mezclas de sustratos postcultivo de champiñón y fibra de coco (micelio Fungisem H-25).

COBERTURA	RENDIMIENTO (kg m ⁻²)	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹)	DIÁMETRO DEL CARPÓFORO	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)
1 TESTIGO SM+FC	23,72 a	95,3 a	34,7 ab	7,32 d
2 TESTIGO TR+CCPA	22,30 ab	89,6 ab	32,2 ab	7,91 d
3 FC-SPC 5:0	23,08 ab	92,7 ab	33,3 ab	7,45 d
4 FC-SPC 4:1	23,13 ab	92,9 ab	33,3 ab	7,71 d
5 FC-SPC 3:2	20,57 bc	82,6 bc	32,7 ab	8,70 c
6 FC-SPC 2:3	18,03 cd	72,4 cd	31,9 b	9,01 bc
7 FC-SPC 1:4	16,71 de	67,1 de	33,6 ab	9,61 ab
8 FC-SPC 0:5	14,16 e	56,9 e	35,1 a	9,74 a
MEDIA	20,21	81,2	33,3	8,43

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). SM: suelo mineral; FC: fibra de coco; TR: turba rubia; CCPA: carbonato cálcico precipitado de azucarera; SPC: sustrato postcultivo de champiñón

Tabla 4. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación de coberturas basadas en sustratos postcultivo de champiñón con buen comportamiento agronómico en experimentos anteriores (micelio Fungisem H-25).

COBERTURA	RENDIMIENTO (kg m ⁻²)	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹)	DIÁMETRO DEL CARPÓFORO	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)
1 TESTIGO SM+FC	19,93 a	104,7 a	31,6 a	6,81 c
2 TESTIGO TR+CCPA	18,82 ab	98,9 ab	30,6 ab	7,49 ab
3 TESTIGO TOPTERRA	17,61 ab	92,5 ab	30,5 ab	6,70 c
4 TESTIGO TORREBLANCA	18,23 ab	95,8 ab	29,0 b	6,98 bc
5 SPC L1	17,13 ab	90,0 ab	29,7 ab	7,92 a
6 SPC L2	16,78 b	88,2 b	30,0 ab	7,83 a
7 TR-SPC 4:1	19,02 ab	100,0 ab	30,7 ab	7,11 bc
8 TR-SPC 3:2	17,15 ab	90,1 ab	30,5 ab	7,81 a
9 FC-SPC 4:1	18,68 ab	98,1 ab	30,1 ab	7,08 bc
10 FC-SPC 3:2	17,16 ab	90,2 ab	30,2 ab	7,97 a
MEDIA	18,05	94,8	30,3	7,37

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). SM: suelo mineral; FC: fibra de coco; TR: turba rubia; CCPA: carbonato cálcico precipitado de azucarera; SPC: sustrato postcultivo de champiñón; L: nivel de lavado

Figura 2. Planteamiento esquemático del trabajo en el área de sustratos para cultivo de *Pleurotus* spp.

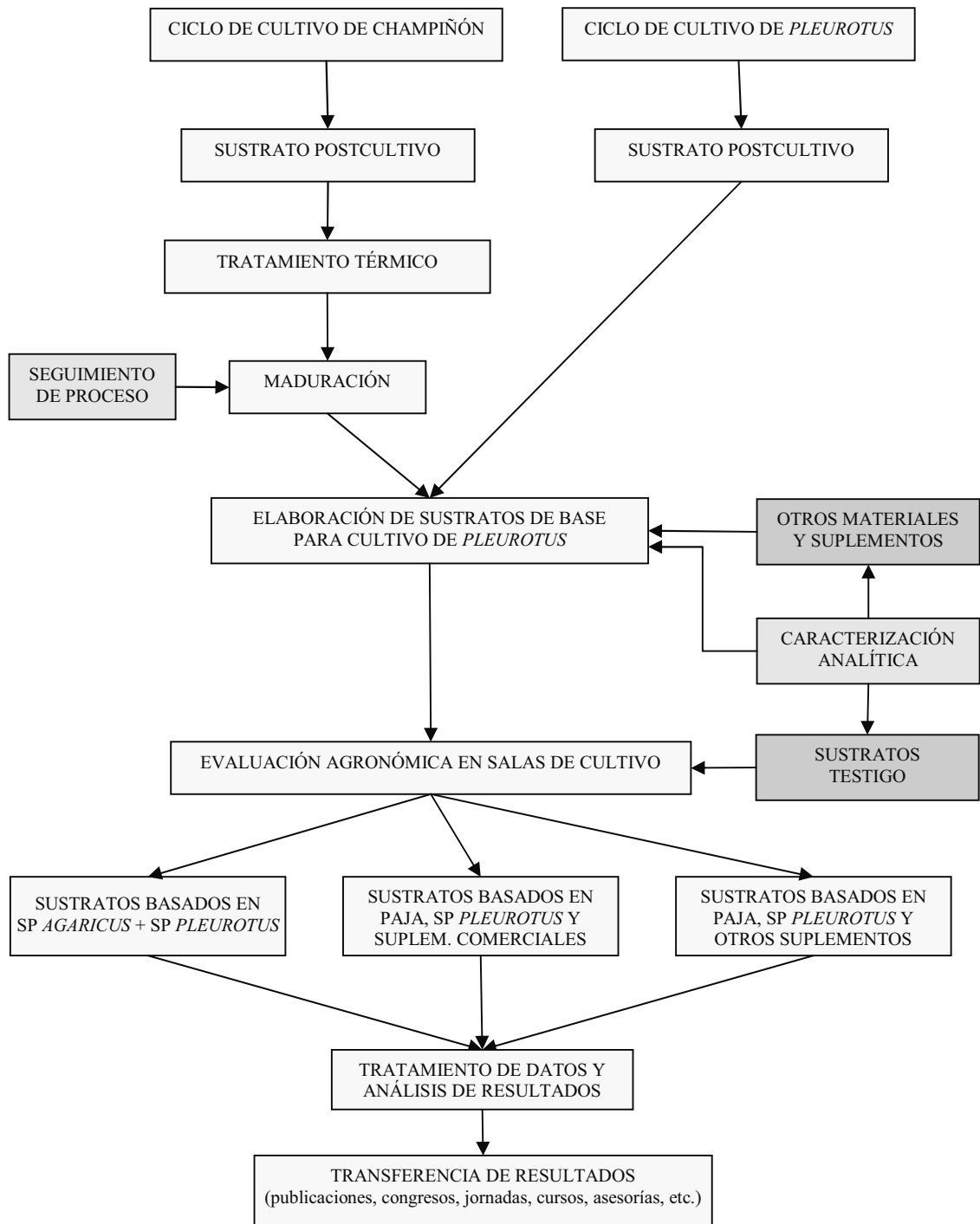


Tabla 5. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación agrónomica de sustratos basados en mezclas de sustratos postcultivo de champiñón y setas (micelio Fungisem K-15).

SUSTRATO	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹ compost)	PESO UNITARIO (g)	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)	PROTEÍNA (g kg ⁻¹)
1 SPP	0,0 e	--	--	--
2 SPP/SPC 9:1	36,0 abc	12,2 b	9,92 bc	15,48 b
3 SPP/SPC 8:2	39,7 ab	10,1 b	10,02 bc	16,14 b
4 SPP/SPC 7:3	27,2 bcd	13,6 ab	9,82 bc	15,73 b
5 SPP/SPC 6:4	22,6 cd	15,1 ab	10,27 b	17,22 ab
6 SPP/SPC 5:5	15,9 de	13,7 ab	11,16 a	18,79 ab
7 COMERCIAL	46,2 a	26,5 a	9,29 c	20,70 a
MEDIA	26,8	15,2	10,08	17,34

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). SPP: sustrato postcultivo de *Pleurotus*; SPC: sustrato postcultivo de champiñón

Tabla 6. Principales parámetros de producción obtenidos de la evaluación agrónomica de sustratos basados en mezclas de paja y sustrato postcultivo de setas con diferentes suplementos (micelio Mispaj S-44).

SUSTRATO	EFICIENCIA BIOLÓGICA (kg 100kg ⁻¹ compost)	PESO UNITARIO (g)	MATERIA SECA (g kg ⁻¹)	PROTEÍNA (g kg ⁻¹)
1 PS	28,72 b	20,7	9,11	19,49
2 PS + Promycel [®]	42,78 ab	25,3	10,35	17,02
3 PS+ Champfood [®]	45,82 a	25,1	10,27	19,08
4 PS+ Calprozime [®]	48,93 a	19,8	10,44	17,68
5 COMERCIAL	48,52 a	24,6	8,81	18,14
MEDIA	42,95	23,1	9,80	18,28

(*) Para cada columna, valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$, test de Tukey). PS: sustrato de base [paja y sustrato postcultivo de *Pleurotus* (1:1, p/p) + 50 g kg⁻¹ CaSO₄ + 10 g kg⁻¹ CaCO₃].

Utilización de los SPCH (sustratos postcultivo de champiñón) como tierra de cobertura para el cultivo de *Agaricus bisporus*

Pérez-Clavijo M.¹, Ezquerro-Ezquerro, L.² y Grijalba-Garrido, S.³

¹Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja. Ctra. Calahorra, Km 4. 26560 Autol. La Rioja.

²IBERCHAMP SAT 9921. C/Calahorra, 10. 26510 Pradejón. La Rioja.

³INTRAVAL-Planta de Compostaje de Pradejón. Camino de las Afueras s/n 26510 Pradejón. La Rioja.

Palabras clave: compost, sustrato postcultivo de hongos (SPCH), hongos cultivados, revalorización.

RESUMEN

Una de las etapas más importantes del cultivo de champiñón es la cobertura. La correcta selección y manejo de la tierra determina el tipo de fructificación del champiñón y la calidad del mismo, la talla de los champiñones y tiene una gran importancia sobre el crecimiento y el precio de costo. Puede suponer el éxito o el fracaso del cultivo.

En este trabajo se ha realizado una evaluación de diferentes mezclas de SPCH y tratamientos para su utilización como alternativa a la tierra de cobertura tradicional. Su elevada conductividad y la posibilidad de presencia de enfermedades hace necesaria una etapa de lixiviación y un proceso de eliminación de posibles contaminantes.

Los resultados obtenidos demuestran viabilidad de los SPCH junto con otros materiales (50/50) para su posterior uso como tierra de cobertura en el propio cultivo del champiñón, reemplazando parte de los materiales actualmente utilizados como las turbas y el gravillín.

INTRODUCCIÓN

Una de las etapas más importantes del cultivo de champiñón es la cobertura. Después de la completa colonización del sustrato por el micelio, se añade una capa de tierra cuyas funciones son favorecer el paso del estado vegetativo del champiñón al crecimiento reproductivo y proporcionar humedad al champiñón. La correcta selección y manejo de la tierra determina el tipo de fructificación del champiñón y la calidad del mismo, la talla de los champiñones y tiene una gran importancia sobre el crecimiento y el precio de costo. Puede suponer el éxito o el fracaso del cultivo (Chikthimmah *et al.*, 2008).

La tierra de cobertura debe tener unas propiedades físicas, químicas y microbiológicas específicas que estimulen y promuevan la iniciación de los primordios. Debe tener una buena estructura, cuanto más compacta sea la estructura de la tierra menos champiñones se desarrollarán en ella, pero más pesados serán, la estructura también afecta al intercambio gaseoso y a la facilidad de manejo de la tierra; estar libre de enfermedades y

tener una elevada capacidad de retención de agua, la primera florada toma el 95 % del agua de la cobertura, la segunda coge el 50 % de la cobertura y el 50 % del compost, la tercera y sucesivas toman el 100 % del agua del compost (Staments y Chilton, 1983).

La tierra utilizada tradicionalmente para el cultivo de champiñón en La Rioja ha sido una mezcla de gravillín con turba rubia que, además de no ser óptima para el cultivo del champiñón, complica el posterior reciclado del sustrato proveniente del cultivo. Por estos motivos, durante los últimos años se tiende al empleo de otro tipo de coberturas basadas en turbas. Pero el costo de la turba, principalmente la turba negra que posee un elevado grado de humedad y encarece el transporte, incrementa mucho el coste final de la tierra de cobertura. Teniendo en cuenta la situación actual, la posibilidad de poder reciclar los sustratos postcultivo de champiñón (SPCH) como tierra de cobertura en el propio cultivo del champiñón, es muy interesante ya que se obtendría una tierra con un costo menor y se daría un valor añadido a los SPCH, revertiendo los beneficios en el propio sector.

El Sustrato Postcultivo de Hongos (SPCH) es un subproducto del cultivo de champiñón. Aparte de su salinidad los SPCH son una fuente rica en nitrógeno, carbono y otros elementos. Contiene una media de 1,12 % de nitrógeno s.m.s. en su forma orgánica mayoritariamente. También contiene una media de 0,67% de fosfatos y un 1,24% de potasio, así como otros nutrientes como el calcio, magnesio y hierro. El SPCH tiene una relación C/N de 13:1, indicando la estabilidad y disponibilidad del compost orgánico (Fidanza, 2007). En La Rioja se generan aproximadamente 300.000 toneladas de SPCH cada campaña, de las cuales más del 80% corresponden al cultivo del champiñón (*A. bisporus* y *A. bitorquis*).

Hay distintas opciones que se han estudiado para reutilizar el SPCH (Rinker, 2002). Entre ellas: el almacenamiento y aplicación a tierras, aplicaciones hortofrutícolas y en jardinería, bio-remediación de suelos contaminados, alimentación animal, obtención de biogas, utilización de extractos de compost por su capacidad antifúngica, preparación de sustrato de otras setas o como tierra de cobertura en mezclas con distintos materiales (Riahi and Arab, 2004).

En este trabajo se ha realizado una evaluación de diferentes mezclas de SPCH y tratamientos para su utilización como alternativa a la tierra de cobertura tradicional. Su elevada conductividad y la posibilidad de presencia de enfermedades hace necesaria una etapa de lixiviación y un proceso de eliminación de posibles contaminantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo y obtención de la productividad

En los ensayos de cultivo se ha utilizado compost de las distintas plantas de compostaje de La Rioja. Los ensayos se realizaron con la misma variedad de semilla, en similares condiciones de cultivo, con tres réplicas de 90 paquetes cada una y con una distribución al azar de las réplicas dentro de la sala de cultivo. Se ha registrado la cantidad

y calidad de champiñón producido en cada uno de los ensayos así como las condiciones de cultivo. La comparación estadística entre las réplicas de cada ensayo se realiza mediante un análisis de varianza ANOVA para un factor y el Test de Duncan ($p < 0,05$) de comparación de medias.

A través de las plantas de compostaje se recogen muestras de todos los lotes de compost utilizados en los cultivos. Se analizan mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) con ecuaciones desarrolladas en el CTICH en un equipo Foss NIRSystem 6500 (Pérez-Clavijo, 2005). Los parámetros analizados son: humedad, cenizas (% s.m.s), nitrógeno orgánico (% s.m.s), amoníaco (% N s.m.s), pH y conductividad (mS/cm) y relación C/N.

En este ensayo se han testado distintos materiales de cobertura con y sin lixiviar y con y sin tratamiento térmico: Turba rubia, Gravillín calizo (mezcla con turba rubia), mezcla de SPCH con turba rubia en distintas proporciones y mezcla de SPCH con tierra testigo en distintas proporciones. Todos los materiales se han caracterizado en pH, conductividad y capacidad de retención de agua. En cada cultivo se incluye como tierra de cobertura testigo, la mezcla Turba negra/Turba rubia 70:30.

Recompostado del SPCH

Una de las limitaciones del uso de los SPCH como tierra de cobertura es la posible presencia de plagas que condiciona la productividad final del cultivo. Se han testado distintos procesos de pasteurización o recompostado tanto en cámara cerrada como en pilas. El proceso seleccionado debe eliminar la contaminación y ser viable desde el punto de vista económico ya que afectará a la futura utilización de los SPCH como tierra de cobertura.

Los SPCH se someten a un proceso de recompostaje aeróbico. El material de partida llega desde los cultivos de champiñón y setas a la Planta de reciclado (INTRAVAL-Pradejón) en paquetes de plástico que se hacen pasar por un trommel o tambor rotativo diseñado para el tratamiento de los SPCH que separa el residuo plástico del sustrato. La materia orgánica obtenida se coloca directamente en la zona de compostaje sobre una cama de trituración vegetal que actúa como “estructurante”. La proporción de fracción vegetal y Sustrato es de 1:1 en volumen. Para homogenizar la fracción vegetal triturada y la fracción orgánica, se hace una pasada rápida de la máquina volteadora y luego se forma la meseta.

El proceso de compostaje se efectúa mediante un sistema abierto de mesetas volteadas, donde tendrá lugar la descomposición y maduración de la materia orgánica. Este proceso tiene una duración mínima de 8 semanas. Cada dos días se pasa la volteadora por la pila o meseta, con el objetivo de homogenizar, airear y fragmentar los materiales blandos más grandes.

Durante el proceso se controla la temperatura, oxígeno y humedad. Durante el proceso de recompostaje se alcanzan temperaturas incluso superiores a los 80° C, con lo

que se asegura la eliminación de posibles patógenos. El producto final se pasa por un trommel de afino, que separa las partes finas de las gruesas.

Lixiviación del SPCH

Los SPCH presentan una conductividad inicial demasiado elevada para emplear dicho material como material único para tierra de cobertura en el cultivo del champiñón. Para disminuir la elevada concentración de sales de los SPCH se intercala un paso de lixiviación.

La lixiviación se realiza en las instalaciones de la Planta de Compostaje Iberchamp SAT tras la última subida de temperatura de los SPCH mediante la aplicación de agua con aspersión muy lentamente. Se han testado distintos espesores de SPCH y orificios de drenaje. El objetivo en este paso ha sido establecer la logística más adecuada para llevar a cabo la lixiviación de un modo práctico, eficaz y con el menor consumo de agua posible.

En la grafica (Figura 1) se puede observar el proceso de lixiviación con el tiempo. A partir de las 45 horas la conductividad se estabiliza en menos de 2 mS/cm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las analíticas de las distintas tierras de cobertura que se han empleado en los ensayos de cultivo. Se han comparado mezclas con y sin tratamiento térmico así como con y sin lixiviación. El pH es variable entre todas las materias primas por lo que, en general, se corrige antes de cubrir el cultivo mediante adición de carbonato cálcico.

En el caso de la conductividad eléctrica, como es lógico las tierras sin lixiviar presentan las conductividades más altas seguidas de las mezclas con mayor porcentaje de SPCH y de las mezclas sin tratamiento térmico. Las mezclas con turba rubia y mezcla de turbas presentan valores más altos que las tierras tradicionales como el gravillín o la turba rubia a pesar de la etapa de lixiviación.

En cuanto al % de saturación, las mezclas con turba rubia ya sea con SPCH o con turba negra son las que mayores valores presentan. Las mezclas con tierra testigo presentan valores un poco menores, muy por encima de la tierra de cobertura con gravillín.

Los resultados de producción se presentan en la tabla 2. En cuanto a la eficiencia biológica (kg de champiñón por cada 100 kg de compost seco), se observa una gran variabilidad en los resultados. Para comparar todas las tierras de cobertura, se obtiene la relación entre la productividad obtenida por cada tierra y la obtenida con la cobertura testigo en su ensayo correspondiente (Figura 2 y Tabla 2).

El análisis de los resultados por separado muestra que, en cuanto al tratamiento y porcentaje de SPCH los valores más bajos se encuentran cuando no se realiza tratamiento térmico. No se presentan diferencias significativas entre las mezclas de 75 % y 50% si bien la experiencia con el manejo de ambas coberturas nos lleva a seleccionar la mezcla 50:50 como la más idónea.

En cuanto al paso de lixiviación se ven claras diferencias entre las tierras con y sin lixiviar, siendo las productividades más altas en el caso de la eliminación de sales antes de la cobertura.

En general se puede observar que no existen grandes diferencias entre las mezclas 50:50 sometidas a tratamiento térmico y lixiviación y las tierras tradicionales. Además en las coberturas con mezcla de SPCH, la incubación de la cobertura es más rápida y uniforme y el inicio de la fructificación se adelanta al menos dos días respecto al resto de tierras. En cuanto a las características de la producción, la buena calidad del champiñón es un resultado claramente diferenciador de las mezclas de cobertura con SPCH (González *et al.*, 2008). Este hecho puede ser interesante para los cultivadores que destinan su producción al mercado en fresco que necesitan menos grado de fructificación y un champiñón con una calidad y contenido en materia seca excepcional.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran viabilidad de los SPCH junto con otros materiales (50/50) para su posterior uso como tierra de cobertura en el propio cultivo del champiñón, reemplazando parte de los materiales actualmente utilizados como las turbas y el gravillín.

Este hecho es sumamente importante ya que se obtendría una tierra de cobertura con un costo mucho más bajo y además se daría un alto valor añadido a los SPCH, disminuyendo su impacto ambiental y revertiendo estos beneficios en el propio sector.

Es necesario un tratamiento térmico y la eliminación de sales para poder utilizar los SPCH.

Aunque los resultados obtenidos frente a otras tierras son menores en cuanto a productividad, la calidad ha sido mejor en la mezcla de cobertura con SPCH, la fructificación ha sido más rápida, el champiñón es más blanco y de tejido más duro y firme.

AGRADECIMIENTOS

A la Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de La Rioja y a las distintas plantas de compostaje por la implicación en el proyecto. Este trabajo ha sido cofinanciado por ADER con el proyecto 2007-I-ID-0054.

REFERENCIAS

CHIKTHIMMAH, N., BEELMAN, R. and LABORDE, L. (2008). Sphagnum Peat Mushroom Casing Soils: Composition, Function and Microbiology. *Mushroom News* **56** (8): 4-9.

- FIDANZA, M. (2007). Mushroom compost improves plant growth. *Mushroom News* **55** (11): 6-8.
- GONZÁLEZ, J., SAN JOSÉ, F., URBINA, C y LÓPEZ, R. (2008). Utilización se Substratos Postcultivo de Hongos (SPCH) como tierra de cobertura en cultivo de champiñón. Efectos sobre la textura. En: Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas. p. 270-276. Eds: Oria R, Val J y Ferrer A. Zaragoza.
- PÉREZ-CLAVIJO, M. (2005). Determinación de las características analíticas del compost de champiñón (*Agaricus Bisporus*) mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (N.I.R.). En: Actas de las IV Jornadas del Champiñón y otros Hongos Cultivados. Quintanar del Rey, Cuenca, 8-9 nov. p. 55-67.
- RIahi, H. and ARAB, A. (2004). Spent Mushroom Compost as an Alternative for Casing Soil. En: Proc. of the XVI International Congress on the Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. Miami, 14-17 march.
- RINKER, D.L. (2002). A Literature Review of Spent Mushroom Substrate Uses Around the World. En: 4th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Cuernavaca, México, 20-23 feb. p. 43-60.
- STAMENTS, P. and CHILTON, J.S. (1983). The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. Agarikon Oress. Olympia, Washington.

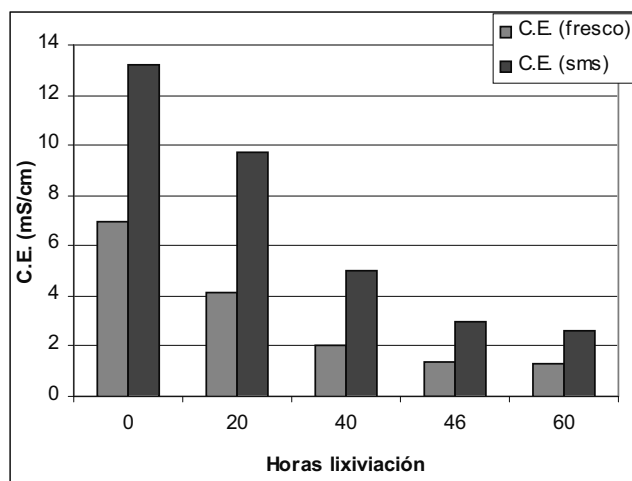


Figura 1. Proceso de lixiviación con el tiempo.

Tabla 1. Características de los materiales de cobertura empleados.

<i>Cobertura</i>	<i>Composición</i>	<i>pH</i>	<i>Conductividad (mS/cm)</i>	<i>% Saturación</i>
GRAVILLIN	800 l turba rubia/t de gravillín	8,21	0,24	68
TESTIGO*	Turba negra + turba rubia (70:30)	7,52	0,28	332
TR	Turba rubia	7,72	0,29	344
SPCH50TR50	SPCH + Turba rubia (50:50) lixiviado	7,81	1,02	349
SPCH50T50	SPCH + Testigo (50:50) lixiviado	7,21	1,39	215
SPCH75T25-S	SPCH + Testigo (75:25) sin tratamiento térmico	7,74	1,92	252
SPCH50T50-S	SPCH + Testigo (50:50) sin tratamiento térmico	7,37	2,04	234
SPCH50T50	SPCH + Testigo (50:50)	7,64	2,17	259
SPCH75T25	SPCH + Testigo (75:25)	7,35	2,4	235
SPCH50TR50-SL	SPCH + Turba rubia (50:50) sin lixiviar	7,88	3,26	346
SPCH50T50-SL	SPCH + Testigo (50:50) sin lixiviar	7,33	4,14	212

* Media de los valores obtenidos en los distintos ensayos

Tabla 2. Resultados de producción obtenidos con cada una de las coberturas ensayadas.

Cobertura	Producción ¹ (kg.kg ⁻¹ compost)				Eficiencia Biológica ²	Relación Testigo ³
	1ª Florada	2ª Florada	3ª Florada	Total		
TESTIGO*	0,203	0,116	0,040	0,353	113,7	1,00 a
TR	0,164	0,116	0,058	0,338	110,3	0,99 a
SPCH50T50	0,182	0,076	0,036	0,295	86,4	0,95 b
GRAVILLIN	0,191	0,112	0,021	0,324	102,2	0,94 b
SPCH50TR50	0,162	0,140	0,022	0,325	100,2	0,92 b
SPCH50T50	0,173	0,155	0,048	0,376	125,1	0,91 b
SPCH75T25	0,150	0,116	0,000	0,266	85,0	0,90 b
SPCH50TR50-SL	0,109	0,149	0,043	0,301	92,8	0,85 c
SPCH50T50-S	0,157	0,148	0,047	0,352	117,1	0,85 c
SPCH75T25-S	0,161	0,138	0,034	0,333	111,0	0,80 c
SPCH50T50-SL	0,111	0,069	0,043	0,223	65,4	0,72 d

(1) kg de champiñón.kg⁻¹ compost

(2) kg de champiñón. 100 kg⁻¹ de compost sobre materia seca.

(3) Ratio con la productividad obtenida por la cobertura testigo del ensayo correspondiente.

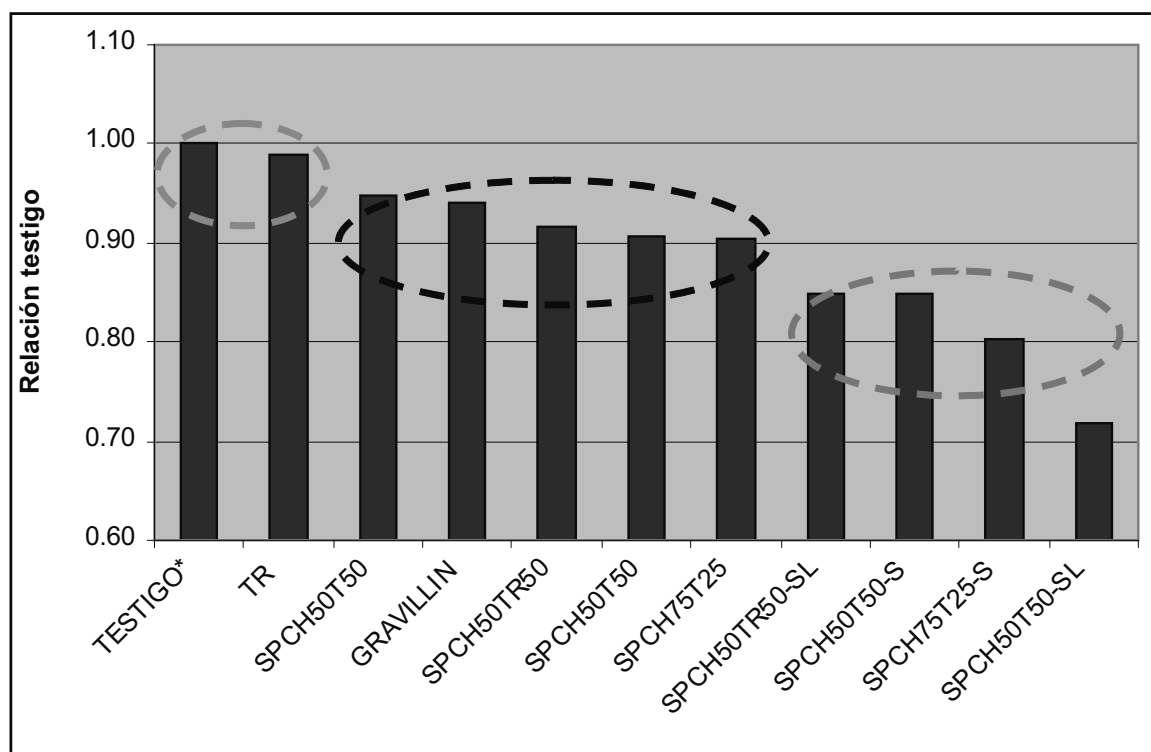


Figura 2. Relación entre la productividad obtenida por cada tierra y la obtenida con la cobertura testigo en su ensayo correspondiente.

Aplicación de nematodos entomopatógenos como método de control de dípteros en el cultivo de champiñón

M.J. Navarro y F.J. Gea

Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

INTRODUCCIÓN

Los dípteros *Megaselia halterata* (Wood) y *Lycoriella auripila* Winnertz (Diptera: Phoridae y Sciaridae) son las plagas más habituales en las explotaciones de champiñón de Castilla-La Mancha (Navarro *et al.*, 2000). Estas moscas, en su estado larvario se alimentan del micelio del hongo e incluso llegan a producir túneles en los champiñones ya formados (Hussey, 1981; Rinker y Snetsinger, 1984; White, 1986; Sandhu y Bhattal, 1987). Por otra parte, los adultos actúan como vectores de otras plagas (ácaros y nematodos) y enfermedades (mole seca) (White, 1981; Clift y Larsson, 1987). Entre estas dos especies, en Castilla-La Mancha predomina el fórido *M. halterata*, ya que presenta poblaciones más abundantes y a lo largo de casi todo el año (excepto en invierno), mientras que *L. auripila* se detecta en menor número y casi exclusivamente durante los meses de primavera (Navarro *et al.*, 2000).

El control de las moscas del champiñón se ha realizado tradicionalmente con insecticidas. Esto ha motivado la aparición de resistencias de alguna de las especies a determinados productos (Keil, 1987; Brewer y Keil, 1989; Bartlett y Keil, 1997). Además, la aplicación de productos fitosanitarios presenta dos problemas añadidos: el efecto fitotóxico sobre el micelio de champiñón, que se traduce en pérdidas de rendimiento y/o de calidad (White, 1992; Geels y Rutjens, 1992; Grewal *et al.*, 1992; Scheepmaker *et al.*, 1998a), y la recuperación de residuos en el champiñón cosechado (Navarro y Gea, 2006). Por otra parte, como consecuencia del proceso de evaluación de materias activas realizado por la Unión Europea, se han retirado un gran número de fitosanitarios, entre ellos, algunos de los autorizados en España para el cultivo de champiñón (benomilo, diazinon, procloraz-manganeso, este último por retirada voluntaria). Otras materias activas siguen en proceso de revisión (ciromazina), incluyendo también algunas que son consideradas insecticidas biológicos (azadiractina). En realidad, en la actualidad únicamente la iprodiona, el diflubenzuron y el deltametrin están ya incluidas en el Anexo I.

Alternativamente a los productos fitosanitarios, existen otros métodos para controlar la presencia de moscas en las explotaciones. Entre ellas destaca la utilización de barreras físicas para la exclusión de los individuos adultos, principalmente en las etapas tempranas del ciclo de cultivo, lo que elimina la posibilidad de que, aprovechando las elevadas temperaturas del interior de los sustratos, se produzca un rápido desarrollo de los dípteros en la explotación (Finley *et al.*, 1984). Las barreras físicas recomendadas son la eliminación de las grietas presentes en los muros, la instalación de mallas antitrips en las entradas y salidas de aire, y la instalación, en las cancelas y en el interior de los locales de cultivo, de luces negras sobre una superficie impermeable tratada con un insecticida de

contacto (Grupo de trabajo fitosanitario del champiñón y otros hongos cultivados, 1997; Coles, 1998).

Sin embargo, en la actualidad la investigación sobre control de plagas se centra en la búsqueda de mecanismos biológicos, es decir, en la utilización de organismos depredadores, parásitos y/o patógenos. En el caso de las moscas del champiñón, los organismos estudiados pertenecen principalmente a tres grupos: ácaros (*Hypoaspis* spp.), bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y nematodos (*Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp.). De entre ellos, los más utilizados son los nematodos entomopatógenos.

Los primeros trabajos relacionados con la utilización de nematodos para el control biológico de las moscas del champiñón se realizaron tras el descubrimiento de la presencia de un nematodo parásito, *Howardula husseyi* (Hussey), que dificultaba el proceso de cría de los fíridos, afectando a la fecundidad y a la longevidad de los adultos (Hussey y Gurney, 1964; Snetsinger, 1972). Sin embargo, el uso de este nematodo no se generalizó debido a problemas de cría y de manejo (Richardson y Chanter, 1979; 1981). Los trabajos se han centrado en la utilización de nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Richardson, 1987), principalmente en el uso de *S. feltiae* (Filipjev) y *S. carpocapsae* (Filipjev), y de *H. bacteriophora* (= *H. heliothidis*) (Khan, Brooks y Hirschmann) y *H. megidis* (Poinar, Jackson y Klein). Estos nematodos infestan las larvas de mosca y liberan en su interior unas bacterias que llevan asociadas (*Xenorhabdus nematophilus* o *Photorhabdus luminescens*), las cuales provocan la muerte del individuo (Kirk y Keil, 2001). El mecanismo de infestación difiere entre los dos géneros. Las especies del género *Steinernema* actúan mediante emboscada, es decir realizan una espera al organismo huésped, y penetran en su interior aprovechando los orificios naturales del cuerpo (boca, ano). Por el contrario, los nematodos del género *Heterorhabditis* presentan una estrategia de infestación deambulante, moviéndose en busca del huésped, y penetran en el interior, además de por los orificios naturales, agujereando la cutícula de las larvas gracias a un estilete que poseen (Bedding y Molyneux, 1982). Este hecho hace que *Heterorhabditis* sea más eficaz en las infestaciones, pero su estrategia deambulante lo hace menos estable en el almacenamiento, ya que agota antes sus reservas energéticas (Kirk y Keil, 2001).

La eficacia de los nematodos en el cultivo de champiñón está condicionada, aparte de por su compatibilidad con los insecticidas utilizados (Rovesti y Deseo, 1990; Grewal *et al.*, 1998), por otros factores, entre los que destacan la temperatura, la humedad y el nivel de CO₂ (Tomalak, 1994). La temperatura óptima de actuación depende de cada grupo, pero se establece en torno a los 25 °C. Con respecto a la humedad existen autores que defienden que niveles inferiores al 60% reducen la eficacia de los nematodos (Tomalak y Lipa, 1991), mientras que otros aconsejan humedades inferiores al 65% (Kirk y Keil, 2001). En relación al dióxido de carbono no existe controversia; los nematodos localizan a los huéspedes por la concentración de CO₂ que se acumula a su alrededor como consecuencia de su actividad fisiológica, por lo que elevados niveles de este gas pueden dificultar la búsqueda (Kirk y Keil, 2001). Ahora bien, mientras que esto sí se ha demostrado con *H. bacteriophora*, no se ha observado tal efecto sobre *S. feltiae* (Scheepmaker *et al.*, 1998b;

Kirk y Keil, 2001), lo que supone una ventaja para la aplicación de este último en las explotaciones de champiñón.

Sin embargo, en trabajos realizados con nematodos en el control de poblaciones de fóridos se ha visto que mientras *H. bacteriophora* puede controlar hasta en un 91% la presencia de estos dípteros, la efectividad de *S. feltiae* no es significativa (Scheepmaker *et al.*, 1995, 1997a, 1998c), probablemente debido al pequeño tamaño que presentan los orificios de las larvas de *Megaselia* spp., junto con el poco tiempo que permanecen estas moscas en estado larvario (Scheepmaker *et al.*, 1998c). Es decir, que el nematodo más eficaz presenta problemas de aplicación (los niveles de CO₂), mientras que el nematodo más estable no es efectivo contra los fóridos. Para el control de estas moscas la bibliografía recoge la alternativa de *S. carpocapsae* que, a dosis de 3 x 10⁶ IJ/m² en cobertura, ha reducido la presencia de la plaga en un 50% (Scheepmaker *et al.*, 1998b). Para que este tratamiento sea más rentable, se pretende hacer coincidir la aplicación de los nematodos con el tercer estado larvario de la mosca, porque es el de mayor tamaño (Scheepmaker *et al.*, 1998c; Jess y Bingham, 2004).

En cuanto a la aplicación de nematodos para el control de los esciáridos, muchos autores defienden la eficacia de *Steinernema feltiae* (Grewal *et al.*, 1993; Rinker *et al.*, 1997; Scheepmaker *et al.*, 1998b; Jess and Kilpatrick, 2000). Sin embargo, existe diferente opinión sobre la fitotoxicidad del tratamiento: hay autores que establecen mejoras en el rendimiento hasta del 20% (Grewal *et al.*, 1992, 1993), otros encuentran reducciones cercanas al 9% (Rinker *et al.*, 1997), mientras que otros no detectan ni un efecto ni otro (Scheepmaker *et al.*, 1998a). Todo ello parece depender de la cepa del nematodo y de la variedad de champiñón utilizadas. Las investigaciones más recientes se han orientado en encontrar cepas de *S. feltiae* más virulentas (Grewal *et al.*, 1993; Tomalak, 1994) y en establecer el sustrato y el momento idóneos de aplicación (Scheepmaker *et al.*, 1996, 1997b; Jess y Bingham, 2004). La búsqueda de cepas más virulentas se realiza con el objetivo de reducir las dosis de aplicación para, por un lado, abaratar costes y, por otro, evitar los problemas derivados de la sobre-infestación. La sobre-infestación puede provocar un debilitamiento del crecimiento micelial (Rinker *et al.*, 1995), a la vez que eleva el número de nematodos por larva, lo que dificulta la regeneración de los nematodos en el interior de la larva muerta y, como consecuencia, la persistencia de los mismos en el sustrato de cultivo (Scheepmaker *et al.*, 1997a). En cuanto a la correcta aplicación del producto, se pretende aunar la presencia de los nematodos con los estadios larvarios iniciales de los esciáridos, que son más susceptibles de infestación.

En el CIES se han realizado diferentes ensayos en los que se han aplicado nematodos entomopatógenos para el control de las moscas del champiñón. En las últimas Jornadas se presentaron los resultados de algunos de ellos, en los que se hacía especial hincapié en la valoración del efecto fitotóxico sobre el cultivo de champiñón. En estos ensayos, tras la aplicación de *S. feltiae* a dosis de 10⁶ y 3x10⁶ IJ/m², se constató un incremento, estadísticamente significativo, en los valores de producción (número de champiñones y rendimiento) y un ligero adelanto en el inicio de la cosecha (Gea y Navarro, 2008). Por otra parte se mostraron también resultados del control de las moscas

que habían infestado, de forma natural, las unidades de cultivo una vez que la mezcla de cobertura ya estaba aplicada sobre el compost germinado. A este respecto, se obtuvo una elevada heterogeneidad de resultados, lo que ha motivado la búsqueda de mecanismos de infestación menos aleatorios. Entre ellos, se ha seleccionado la infestación natural sobre compost parcialmente germinado para la realización de los ensayos cuyos resultados se muestran a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han realizado dos ensayos para contrastar la eficacia de los nematodos entomopatógenos *Steinernema feltiae* y *S. carpocapsae* en el control de las moscas del champiñón *M. halterata* y *L. auripila*. Para ello se utilizaron las cabinas experimentales de cultivo con condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y ventilación) del CIES. En su interior se ubicaron, en cada ensayo, 44 cubetas, distribuidas en 4 lotes, uno de los cuales, el lote Control (C) no fue sometido a la infestación. Los otros tres lotes corresponden a los siguientes tratamientos: lote Control infestado (CI), compost sometido a la infestación pero que posteriormente no recibió ningún tratamiento de control biológico; lote *Steinernema feltiae* (Sf), compost sometido a infestación y con una aplicación posterior de *S. feltiae* a razón de 10^6 IJ/m²; lote *S. feltiae*-*S. carpocapsae* (Sf+Sc), compost sometido igualmente a infestación y con una aplicación posterior de una combinación de estas dos especies de nematodos a razón de $0,5 \times 10^6$ IJ/m² de cada una de ellas, lo que hace un total de 10^6 IJ/m².

Cada una de las cubetas utilizada tiene una capacidad de 5 kg de compost comercial, inoculado con micelio comercial al 0,9% en peso, y una superficie de cultivo de 870 cm². El día de la siembra, sobre cada una de las cubetas del lote Control se colocó una estructura en forma de cubo con las caras fabricadas con malla antitrips; del interior del cubo colgaba una trampa adhesiva amarilla para la captura de moscas. Tras unos días germinando (5 en el Ensayo I y 12 días en el Ensayo II), las cubetas de los lotes CI, Sf y Sf+Sc fueron trasladadas a una nave de cultivo próxima, en la que se había permitido la proliferación de moscas y cuyas poblaciones fueron valoradas también mediante placas adhesivas. Después de dos días en las naves, periodo durante el cual se produjo la infestación natural del compost, las cubetas fueron de nuevo reubicadas en las cabinas y cubiertas con el cubo de malla antitrips descrito anteriormente. Quince días después de la siembra se procedió a la cobertura de las 44 cubetas con topterra previamente hidratada, a razón de 3,5 L de cobertura por cubeta, lo que supone un espesor aproximado de 4-4,5 cm sobre el compost. Al día siguiente de la cobertura se aplicaron los nematodos, a las dosis indicadas, junto con 1 ml de quitosano y en un volumen de agua de 150 ml por cubeta. El desarrollo del ciclo de cultivo se realizó de la manera habitual y se prolongó hasta que el número de individuos capturados en las placas se estabilizó. Posteriormente se procedió en el laboratorio al recuento e identificación, bajo lupa binocular, de las moscas capturadas.

Estos ensayos difieren únicamente en el tiempo transcurrido desde la infestación hasta la aplicación de los nematodos (8-10 días en el Ensayo I y 1-3 días en el Ensayo II) y

en el tamaño de las poblaciones de las moscas contaminantes ((800 fóridos + 52 esciáridos/día) en el Ensayo I y (1.237 fóridos + 82 esciáridos/día) en el Ensayo II).

Los resultados obtenidos tras el recuento de las placas fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA), con el paquete informático Statgraphics Plus v. 4.1 (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de *Megaselia halterata*

Las Figuras 1 y 2 muestran el valor medio, obtenido tras el análisis estadístico de los datos, del número de fóridos adultos capturados por placa para cada uno de los ensayos realizados. En el Ensayo I (Fig. 1) se observa como, frente al control, en las cubetas del control infestado el número de capturas es significativamente superior. Así mismo se ve como en los lotes en los que se han aplicado los nematodos, aunque hay un ligero descenso, el número de fóridos capturados no difiere significativamente del control infestado.

En el Ensayo II (Fig.2) los resultados son similares, aunque en este caso no se detecta ninguna disminución en el número de fóridos capturados en los lotes con nematodos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que, en las condiciones ensayadas, no se detecta control alguno de ninguna de las dos especies de nematodos sobre *Megaselia halterata*. Estos resultados coinciden con la bibliografía consultada en la poca efectividad de *S. feltiae* sobre los fóridos. Sin embargo, en contra de los resultados de Scheepmaker *et al.* (1998b), en estos ensayos no se detecta ningún control de *S. carpocapsae* sobre el fórido considerado; esta discordancia puede estar motivada por las diferentes dosis y/o momentos de aplicación de los nematodos.

Control de *Lycoriella auripila*

Las Figuras 3 y 4 muestran el número medio de esciáridos adultos capturado por placa en cada uno de los ensayos desarrollados. En ambos ensayos, el número de esciáridos capturados en el lote Control infestado difiere significativamente del número de capturas en el lote Control.

Por otra parte, en el primer ensayo (Fig. 3) se observa un descenso significativo en el número de capturas en los dos tratamientos con nematodos frente al lote Control infestado, aunque de forma algo más acusada en el lote al que se aplicaron únicamente nematodos de la especie *Steinernema feltiae* (eficacia del 62% frente al 50% obtenido en el tratamiento conjunto de las dos especies de nematodos). Estos resultados, aunque positivos, están lejos de los valores de 90-80% de control sobre los esciáridos encontrados en la bibliografía (Grewal *et al.*, 1993; Jess and Kilpatrick, 2000). Por otra

parte, en el segundo ensayo las diferencias significativas entre los tratamientos con nematodos y el control infestado desaparecen; esto puede deberse a la mayor tasa de infestación de moscas utilizada en este caso, junto con el menor tiempo transcurrido entre la infestación y la aplicación de los nematodos.

REFERENCIAS

- BARTLETT, G.R. y KEIL, B.O.C. (1997). Identification and characterization of a permethrine resistance mechanism in populations of the fungus gnat *Lycoriella mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **58**:173-181.
- BEDDING, R.A. y MOLYNEUX, A.S. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* **28**: 354-359.
- BREWER, K.K. y KEIL, C.B. (1989). Permethrin resistance in *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae). *J. Econ. Entomol.* **82**(1): 17-21.
- CLIFT, A.D. y LARSSON, S.F. (1987) Phoretic dispersal of *Brennandania lambi* (Kraczal) (Acari: Tarsonemida: Pygmephoridae) by mushroom flies (Diptera: Sciaridae and Phoridae) in New South Wales, Australia. *Exp. Appl. Acarol.* **3**: 11-20.
- COLES, P.S. (1998). Pest exclusion et its role in Integrated Pest Management. *Mushroom News* **46**(11): 26-29.
- FINLEY, R.J., WUEST, P.J., ROYSE, D.J., SNETSINGER, R.J., TETRAULT, R. y RINKER, D.L. (1984). Mushroom flies. *Mushroom J.* **139**: 240-247.
- GEA, F.J. y NAVARRO, M.J. (2008). Insecticidas químicos, biológicos y nematodos entomopatógenos aplicados para el control de dípteros en el cultivo de champiñón: efecto fitotóxico y actividad biológica. En: *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados 3. Actas de las IV Jornadas Técnicas del Champiñón y otros Hongos Comestibles en Castilla-La Mancha*. PATRONATO DE DESARROLLO PROVINCIAL. DIPUTACIÓN PROVINCIAL DE CUENCA (Eds.). 237-246.
- GEELS, F.P. y RUTJENS, A.J. (1992). Bendiocarb and diflubenzuron as substitute insecticides for endosulfan in commercial mushroom growing. *Ann. appl. Biol.* **120**: 215-224.

- GREWAL, P.S., RICHARDSON, P.N., COLLINS, G. y EDMONDSON, R.N. (1992). Comparative effects of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) and insecticides on yield and cropping of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Ann. appl. Biol.* **121**: 511-520.
- GREWAL, P.S., TOMALAK, M. KEIL, C.B.O. y GAUGLER, R. (1993). Evaluation of a genetically selected strain of *Steinernema feltiae* against the mushroom sciarid *Lycoriella mali*. *Ann. appl. Biol.* **123**: 695-702.
- GREWAL, P.S., WEBER, T. y BETTERLY, D.A. (1998). Compatibility of the insect-parasitic nematode, *Steinernema feltiae*, with chemicals used in mushroom production. *Mushroom News* **46**(4): 6-10.
- GRUPO DE TRABAJO FITOSANITARIO DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGOS COMESTIBLES (1997). *Plagas y enfermedades del champiñón y setas cultivadas. Nuevo ácaro del champiñón Brennandania lambi (Krczal)*. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Eds). Madrid. 8 pp.
- HUSSEY, N.W. (1981). Cultural innovation: its implications for mushroom pest control. *Mushroom Sci.* **XI**: 523-536.
- HUSSEY, N.W. y GURNEY, B. (1964). Rearing techniques for mushroom fly. *Pl. Path.* **13**: 38-39.
- JESS, S. y BINGHAM, J.F.W. (2004). Biological control of sciarid and phorid pests of mushroom with predatory mites from the genus *Hypoaspis* (Acari: Hypoaspidae) and the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Bull. Entomol. Research* **94**: 159-167.
- JESS, S. y KILPATRICK, M. (2000). An integrated approach to the control of *Lycoriella solani* (Diptera: Sciaridae) during production of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Pest Manag. Sci.* **56**: 477-485.
- KEIL, C.B. (1987). Control of adult *Lycoriella mali* and *Megaselia halterata*. En: *Cultivating Edible Fungi*. WUEST, P.J., ROYSE, D.J. y BEELMAN, R.B. (Eds.). Amsterdam: Elsevier. 587-597.
- KIRK, D.J. y KEIL, C.B. (2001). Factors influencing efficacy of two- entomopathogenic nematodos used for fly control in commercial mushroom crops. *Mush. News* **49**(4): 4-17.
- NAVARRO, M.J., ESCUDERO, A., GEA, F.J., LÓPEZ-LORRIO, A., GARCÍA-MORRÁS, J.A. y FERRAGUT, F. (2000). Determinación y abundancia estacional de las

poblaciones de dípteros (Diptera: Phoridae y Sciaridae) en los cultivos de champiñón en Castilla-La Mancha. *Bol. San. Veg. Plagas* **26**(4): 527-536.

NAVARRO, M.J. y GEA, F.J. (2006). Estudio de la fitotoxicidad del insecticida diflubenzuron en el cultivo de champiñón. Estudio del nivel de residuos. *Boletín de la Asociación Española de Cultivadores de Champiñón* **48**: 32-34

RICHARDSON, P.N. (1987). Susceptibility of mushroom pests to the insect-parasitic nematode *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *Ann. appl. Biol.* **111**: 433-438.

RICHARDSON, P.N. y CHANTER, D.O. (1979). Phorid fly (Phoridae: *Megaselia halterata*) longevity and the dissemination of nematodes (Allantonematidae: *Howardula husseyi*) by parasitised females. *Ann. appl. Biol.* **93**: 1-11.

RICHARDSON, P.N. y CHANTER, D.O. (1981). Aspects of the laboratory production of mushroom phorid flies (*Megaselia halterata*) parasitised by the nematode *Howardula husseyi*. *Ann. appl. Biol.* **99**:1-9.

RINKER, D.L. y SNETSINGER, R.J. (1984). Damage threshold to a commercial mushroom by a mushroom-infesting phorid (Diptera: Phoridae). *J. Econ. Entomol.* **77**: 449-453.

RINKER, D.L., OLTHOF, T., DANO, J. y ALM, G. (1995). Effect of entomopathogenic nematodes on control of a mushroom-infesting sciarid fly and on mushroom production. *Biocontrol Sci. Technol.* **5**: 109-119.

RINKER, D.L., ALM, G. y OLTHOF, T.H.A. (1997). Use of the nematode *Steinernema feltiae* to control the sciarid fly. *Mushroom News* **45**(4): 6-11.

ROVESTI, L. y DESEÖ, K.K. (1990). Compatibility of chemical pesticides with entomopathogenic nematodes, *S. carpocapsae* Wieser and *S. feltiae* Filipzev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* **36**: 237-245.

SANDHU, G.S. y BHATTAL, D.S. (1987). Biology of phorid fly, *Megaselia sandhui* Disney (Diptera: Phoridae) on temperate mushroom. En: *Cultivating Edible Fungi*. WUEST, P.J., ROYSE, D.J. y BEELMAN, R.B. (Eds.). Amsterdam: Elsevier. 395-404.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P. y van GRIENSVEN, L.J.L.D. (1995). Control of the mushroom sciarid (*Lycoriella auripila*) and the mushroom phorid (*Megaselia*

halterata) by entomopathogenic nematodes. En: *Science and Cultivation of Edible Fungi*. T. ELLIOT (Eds.). Rotterdam: Balkema. 491-498.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., van GRIENSVEN, L.J.L.D. y SMITS, P.H. (1996). Substrate dependent larval development and emergence of the mushroom pests *Lycoriella auripila* y *Megaselia halterata*. *Entomol. exp. Appl.* **79**: 329-334.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., SMITS, P.H. y van GRIENSVEN, L.J.L.D. (1997a). Control of the mushroom pests, *Lycoriella auripila* (Diptera: Sciaridae) and *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae) by *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) in field experiments. *Ann. appl. Biol.* **131**: 359-368.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., SMITS, P.H. y van GRIENSVEN, L.J.L.D. (1997b). Location of immature stages of the mushroom insects pest *Megaselia halterata* in mushroom-growing medium. *Entomol. exp. Appl.* **83**: 323-327.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., RUTJENS, A.J., SMITS, P.H. y Van GRIENSVEN, L.J.L.D. (1998a). Influence of *Steinernema feltiae* y diflubenzuron on yield and economics of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* in Dutch mushroom culture. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**: 269-275.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., RUTJENS, A.J., SMITS, P.H. y Van GRIENSVEN, L.J.L.D. (1998b). Comparison of the efficacy of entomopathogenic nematodes for the biological control of the mushrooms pests *Lycoriella auripila* (Sciaridae) and *Megaselia halterata* (Phoridae). *Biocontrol Sci. Technol.* **8**: 277-288.

SCHEEPMAKER, J.W.A., GEELS, F.P., van GRIENSVEN, L.J.L.D. y SMITS, P.H. (1998c). Susceptibility of larvae of the mushroom fly *Megaselia halterata* to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in bioassays. *Biocontrol* **43**: 201-214.

SNETSINGER, R. (1972). Laboratory studies of mushroom-infesting arthropods. *Mushroom Sci.* **VIII**: 199-208.

TOMALAK, M. (1994). Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of the mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnerzt (Diptera: Sciaridae). *Biocontrol Sci. Technol.* **4**: 187-198.

TOMALAK, M. y LIPA, J.J. (1991). Factors affecting entomophilic activity of *Neoplectana feltiae* in mushroom compost. *Entomol. Exp. Appl.* **59**: 105-110.

WHITE, P.F. (1981). Spread of the mushroom disease *Verticillium fungicola* by *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae). *Prot. Ecol.* **3**: 17-24.

WHITE, P.F. (1986). The effects of sciarid larvae (*Lycoriella auripila*) on the yield of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Ann. appl. Biol.* **109**: 11-17.

WHITE, P.F. (1992). The comparative effects of three formulations of diazinon on cropping of a hybrid and non-hybrid strain of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Ann. appl. Biol.* **121**: 655-668.

Ensayo I

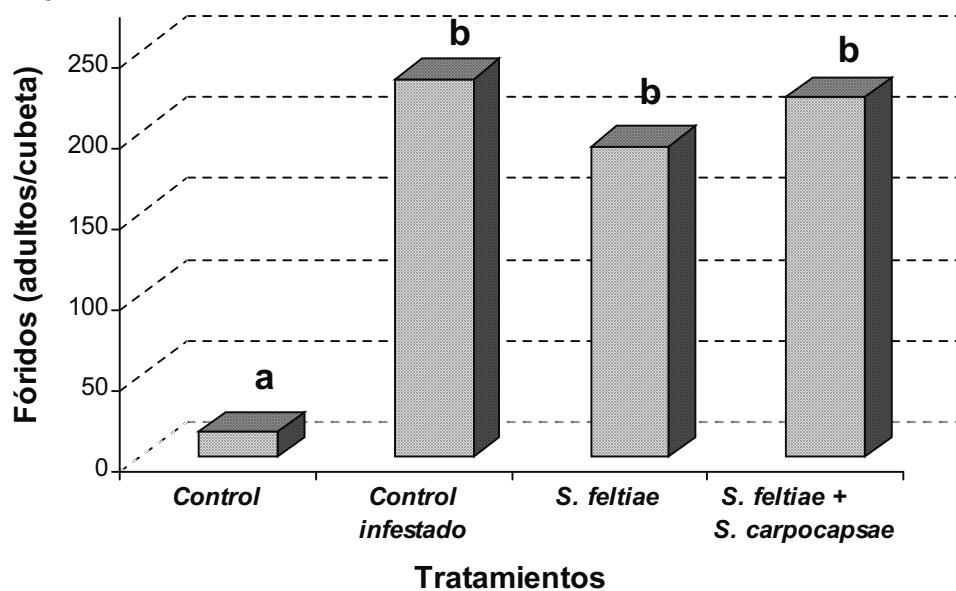


Figura 1. Número medio de fóridos adultos capturados por placa para cada uno de los tratamientos aplicados en el Ensayo I.

Ensayo II

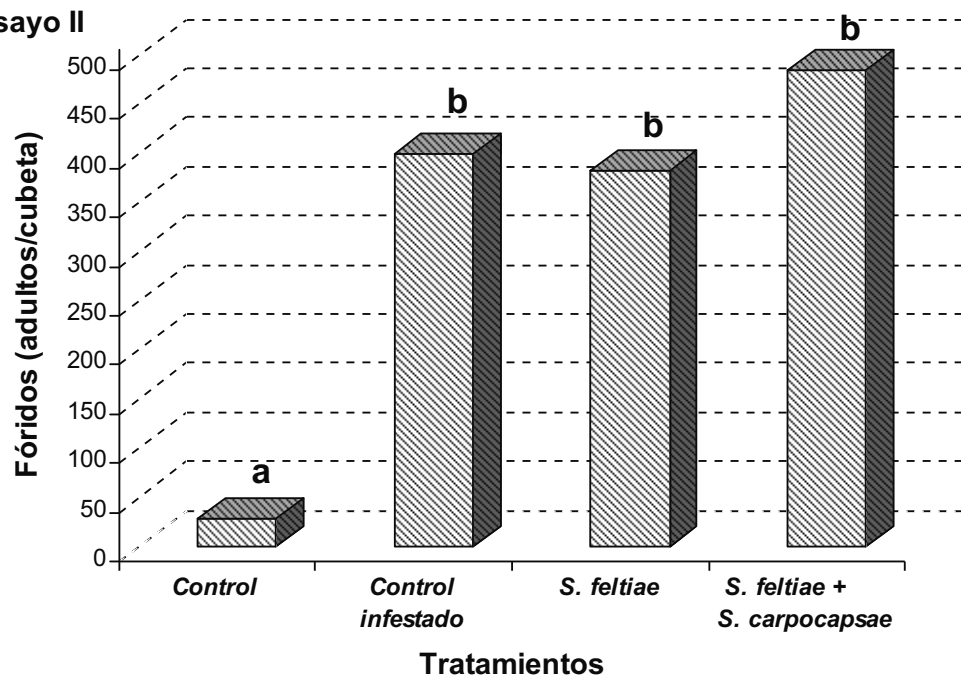


Figura 2. Número medio de fóridos adultos capturados por placa para cada uno de los tratamientos aplicados en el Ensayo II.

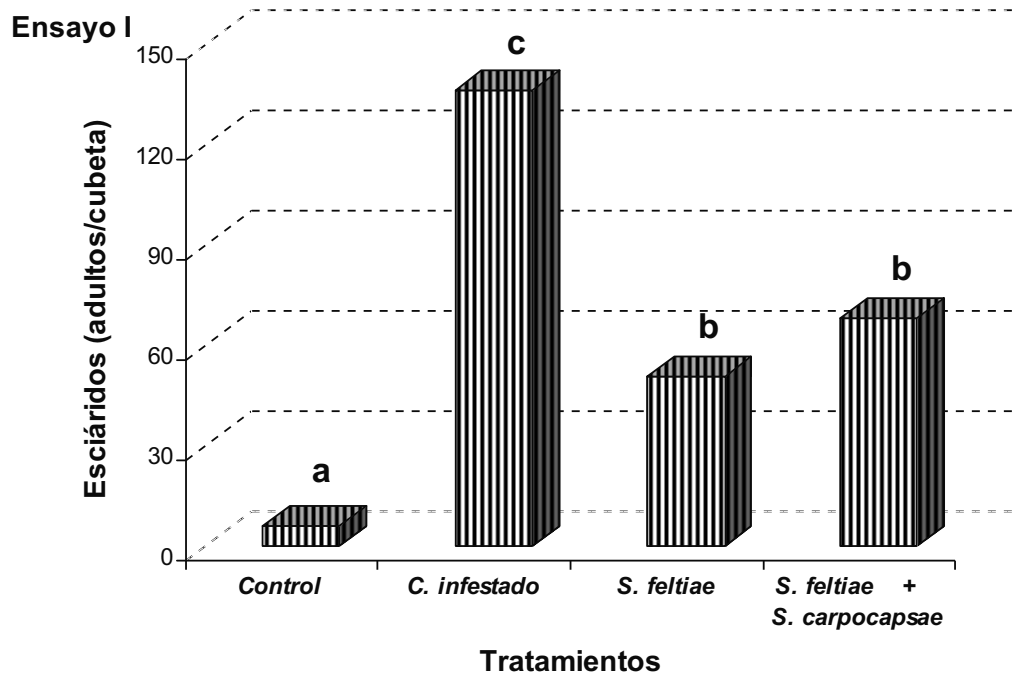


Figura 3. Número medio de esciáridos adultos capturados por placa para cada uno de los tratamientos aplicados en el Ensayo I.

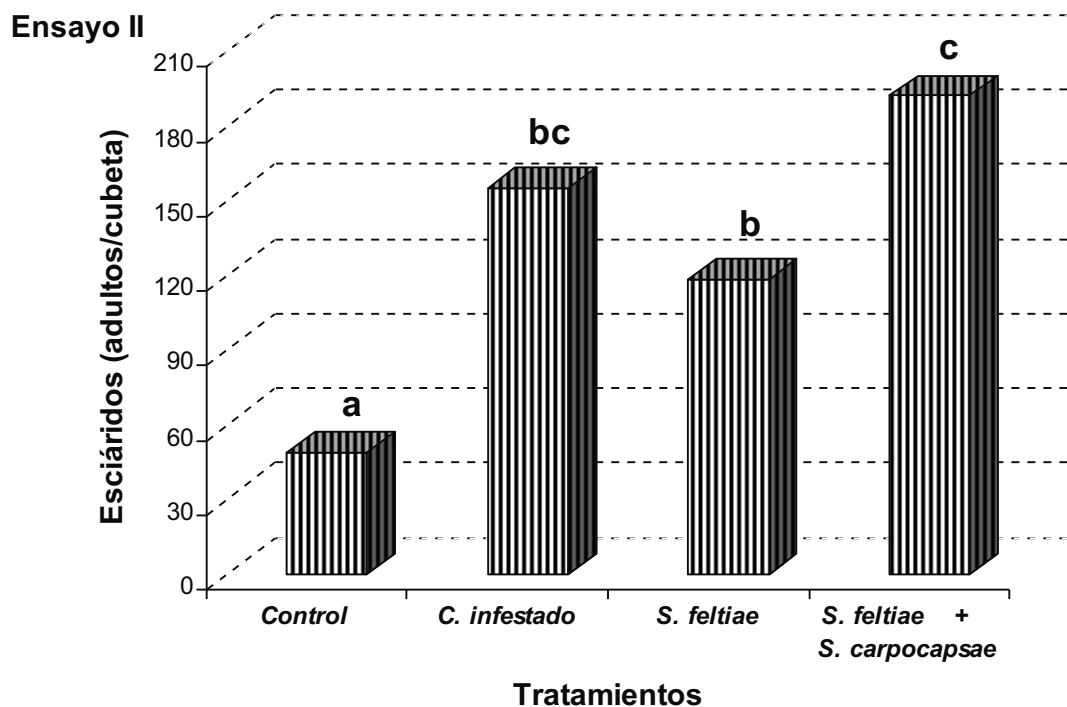


Figura 4. Número medio de esciáridos adultos capturados por placa para cada uno de los tratamientos aplicados en el Ensayo II.

Efecto de varios fungicidas sobre la mole húmeda (*Mycogone perniciosa*) y sobre la producción de champiñón

F.J. Gea¹, M.C. Lainez² y M.J. Navarro¹

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

²IES Amparo Sanz. Albacete.

INTRODUCCIÓN

La mole húmeda, causada por el hongo micoparásito *Mycogone perniciosa* (Magnus) Delacroix, es una enfermedad del champiñón [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] que también se desarrolla sobre otras especies de *Agaricales*. A pesar de su distribución mundial no suele causar importantes pérdidas en los cultivos de champiñón (Fletcher y Gaze, 2008), aunque recientemente ha originado serios problemas en algunos países como Serbia (Glamoclija *et al.*, 2008) y Sudáfrica (Meyer y Korsten, 2008). *M. perniciosa* esporula abundantemente sobre los cuerpos fructíferos de *Agaricus*, produciendo conidios de paredes delgadas parecidos a los de *Verticillium* y clamidosporas bicelulares esféricas de color oscuro y pared gruesa, con una célula apical verrugosa y una célula basal de pared delgada (Holland y Cooke, 1990). Este micoparásito afecta la morfogénesis de los basidiomas de *A. bisporus*, formando masas deformes de tejido sin ningún signo de diferenciación. Inicialmente las moles húmedas son esponjosas y de color blanco, virando posteriormente al color oscuro. Ocasionalmente pueden exudar sobre su superficie gotas de color ámbar debido a la putrefacción bacteriana que se produce en su interior. Al corte, se puede observar que las masas deformes muestran áreas oscuras justo debajo de la superficie exterior del esporóforo. A veces, los síntomas causados por *M. perniciosa* son parecidos a los ocasionados por *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk [recientemente clasificado como *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams (Zare y Gams, 2008)], por lo que la presencia de la mole húmeda puede quedar enmascarada por la mole seca. La mezcla de cobertura siempre ha sido considerada como la principal fuente de contaminación de *M. perniciosa*, por lo que es particularmente importante asegurar que los materiales de cobertura estén limpios y almacenados en un área segura, sin riesgos de terminar contaminados por polvo o restos procedentes de otras naves de cultivo (Fletcher y Ganney, 1968). *M. perniciosa* puede ser diseminado por el agua de riego, al igual que *V. fungicola*, pero a diferencia de éste, las esporas no son pegajosas, por lo que las moscas y los recolectores tienen menos importancia en su diseminación.

La aparición de la mole húmeda en los cultivos de champiñón españoles ha sido esporádica durante los últimos veinte años. Hasta ahora, el control se había realizado mediante el uso de productos fitosanitarios (fungicidas benzimidazoles y procloraz-Mn), prácticas culturales e higiene (Fletcher *et al.*, 1975, 1983; Gandy y Spencer, 1978; Gea *et al.*, 1995). La incidencia actual de la enfermedad es baja o nula en cultivos bien conducidos, pero la mole húmeda se puede convertir en una seria amenaza para los cultivos de champiñón. De hecho, durante el otoño de 2006, se detectaron fuertes ataques

de mole húmeda en algunos cultivos comerciales de *A. bisporus*, lo que puso de manifiesto la necesidad de llevar a cabo un estudio con el fin de desarrollar medidas de control más eficaces y de valorar la actual sensibilidad de *M. pernicioso* a varios fungicidas, para poder determinar si se había desarrollado alguna resistencia.

Hay que tener en cuenta que la disponibilidad de fungicidas en el cultivo del champiñón está limitada no solo por estrictas regulaciones sino también por el hecho de que tanto el patógeno como el huésped son hongos. Por esta razón, en este estudio se han usado fungicidas que están autorizados en España (iprodiona y procloraz-Mn), o que han sido ampliamente utilizados en otros países europeos (carbendazima y metil-tiofanato) o en Estados Unidos (metil-tiofanato y tiabendazol). Todos estos fungicidas están incluidos en el Anexo I de la Directiva 91/414/EEC, aunque la carbendazima está solo autorizada en cereales, colza, remolacha y maíz.

Por tanto, el objetivo de este estudio es determinar la sensibilidad *in vitro* de aislados de *M. pernicioso* frente a los fungicidas seleccionados y la efectividad de estos fungicidas frente a la mole húmeda en cultivos de champiñón artificialmente infectados con *M. pernicioso*. La información obtenida puede ayudar a conocer mejor cómo se desarrolla esta enfermedad, al tiempo que puede contribuir a diseñar estrategias de control más eficaces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron doce aislados de *M. pernicioso* recuperados de cuerpos fructíferos de *A. bisporus* que mostraron síntomas de mole húmeda. Las muestras se recogieron entre los años 2006 y 2009 en cultivos de champiñón situados en Castilla-La Mancha. Los aislados se cultivaron en medio agar-patata dextrosa (PDA) y se identificaron de acuerdo con los criterios taxonómicos descritos por Brady y Gibson (1976).

Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *M. pernicioso* a los fungicidas

Para determinar la sensibilidad *in vitro* de *M. pernicioso* a los fungicidas se utilizaron las formulaciones comerciales de las siguientes materias activas: carbendazima 50% pm (Bavisfor[®] 50, IQV, Mollet del Vallés, Barcelona, Spain), iprodiona 50% pm (Rovral[®] WP, Agrodén, Madrid, Spain), procloraz-Mn 46% pm (Sporgon[®], Basf Española, Barcelona, Spain), tiabendazol 60% sc (Textar[®] 60-T, Tecnidex, Paterna, Valencia, Spain) y metil-tiofanato 70% wg (Topsin[®] 70 WG, Bayer CropScience, Alcácer, Valencia, Spain).

Los fungicidas se disolvieron en agua destilada estéril y se añadieron al medio de cultivo esterilizado (agar-extracto de malta enfriado a 45-50 °C), con el fin de conseguir diversas concentraciones de materia activa (entre 0,001 y 100 µg ml⁻¹). Las placas de medio con fungicida se sembraron con discos de 5 mm de diámetro, procedentes de la zona

con crecimiento activo de un micelio de *M. pernicioso*. Se realizaron cuatro replicados por cada combinación de aislado y concentración fungicida. Las placas Petri se incubaron durante 12 días a 25 °C en oscuridad y posteriormente se determinó el tamaño de las colonias midiendo dos diámetros perpendiculares por cada placa.

Se valoró la tasa de crecimiento micelial para cada aislado, utilizando las placas control a las que no se había añadido fungicida. A continuación, se calculó el porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial mediante la ecuación de Vincent (1947): $PI = 100(C-T)/C$ (C = tasa de crecimiento del control; T = tasa de crecimiento en las placas tratadas con fungicida).

La sensibilidad de la población de aislados de *M. pernicioso* se estimó mediante el cálculo de la ED_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$ de materia activa necesarios para inhibir el crecimiento radial al 50%). Para cada fungicida también se determinó el factor de resistencia, el cual se expresa como la relación entre el valor más elevado de ED_{50} de los aislados considerados, frente al valor medio de ED_{50} para cada combinación de aislados-fungicida.

Los valores de ED_{50} se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

Ensayos en cámaras de cultivo de champiñón

Para valorar la eficacia de los fungicidas frente a la mole húmeda en cultivos de champiñón artificialmente infectados con *M. pernicioso* se realizaron dos ciclos de cultivo en una cámara visitable Ibercex (ASL, S.A., San Fernando de Henares, Madrid, España) de dimensiones 3,70 x 2,10 x 2,60 m (20,2 m³), provista de sistemas de humidificación, calefacción/refrigeración, y recirculación/ventilación exterior, que permite el control automático de la temperatura, la humedad relativa y la concentración de dióxido de carbono. Se utilizaron cubetas de 16 l de volumen y una superficie de 870 cm², cada una de las cuales se llenó con 6 kg de compost. La variedad comercial de micelio de *Agaricus bisporus* utilizada fue Gurelan 45 (Gurelan S. Coop., Huarte, Pamplona), a una tasa de siembra del 1% en peso fresco del compost. La capa de cobertura aplicada estaba formada por una mezcla de suelo mineral y turba rubia en proporción 4:1 (v/v), que es la habitual en el sector productor de Castilla-La Mancha. En cada cubeta se depositó una capa de 30 mm de espesor y 2.6 l de volumen.

Se realizaron dos ensayos (A y B), que diferían en la concentración de esporas usada como tasa de inoculación para cada ensayo: 10⁶ esporas m⁻² en el ensayo A y 10⁷ esporas m⁻² en el ensayo B. La inoculación se llevó a cabo dos días después de realizar la cobertura, aplicando una suspensión de esporas de *M. pernicioso* sobre la superficie de ésta, a razón de 10 ml por cubeta. El inóculo de *M. pernicioso* se preparó el mismo día en que se realizó la inoculación. La concentración de cada suspensión de esporas se determinó mediante un hematocitómetro. Cada suspensión se diluyó en agua estéril hasta conseguir una concentración de 8,7 x 10³ esporas ml⁻¹ (ensayo A) y 8,7 x 10⁴ esporas ml⁻¹ (ensayo B). Las cubetas control recibieron 10 ml de agua estéril.

Se utilizaron formulaciones comerciales de los siguientes fungicidas: carbendazima, iprodiona, tiabendazol y metil-tiofanato al 0.1% (p/v) y procloraz al 0.05% (p/v). Se añadieron en riego, disueltos en agua, a razón de 100 ml por cubeta. Para cada fungicida se realizaron dos tratamientos y seis repeticiones por tratamiento. El primer tratamiento (BI) se efectuó el mismo día de la cobertura (día 0), es decir, dos días antes de llevar a cabo la inoculación con esporas de *M. perniciosa*. El segundo tratamiento (AI) se aplicó el quinto día después de la cobertura, 3 días después de la inoculación. A las cubetas control se les añadieron 100 ml de agua.

Durante las tres primeras floradas, se anotaron los datos correspondientes al número y peso de los champiñones recogidos en cada uno de los tratamientos aplicados. Los champiñones recolectados se clasificaron como sanos o infectados por *M. perniciosa*. La incidencia de la enfermedad se calculó como un porcentaje, basada en la relación entre el número de champiñones enfermos frente al número total champiñones (sanos y enfermos). La eficacia de los fungicidas se valoró mediante la fórmula de Abbott (1925): % eficacia = $[(I_c - I_t) / I_c] \times 100$ (donde I_c = incidencia de la enfermedad en el control; I_t = incidencia de la enfermedad en el tratamiento). El efecto de los fungicidas sobre la productividad de champiñón se evaluó mediante la eficiencia biológica (EB), calculado como el porcentaje del peso fresco total de los champiñones cosechados (sanos y enfermos) frente al peso del sustrato seco en el momento de la siembra y expresado mediante la fracción: kg/100 kg compost.

El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar con seis repeticiones. Los datos de eficiencia biológica y eficacia total se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), previa transformación $\arcsin\sqrt{x/100}$.

RESULTADOS

Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *M. perniciosa* a los fungicidas

En la Tabla 1 se presentan los valores medios de ED₅₀ de los fungicidas seleccionados y los factores de resistencia de doce aislados de *M. perniciosa*. El fungicida que inhibió el crecimiento *in vitro* de *M. perniciosa* con más eficacia fue el procloraz-Mn (ED₅₀ media= 0,029 µg ml⁻¹), seguido por la carbendazima (ED₅₀ media= 0,065 µg ml⁻¹). Por el contrario, los valores de ED₅₀ más elevados se obtuvieron con iprodiona (ED₅₀ media= 2,678 µg ml⁻¹). Los factores de resistencia calculados fueron relativamente bajos, oscilando entre 1,42 para iprodiona y 2,44 para metil-tiofanato.

La distribución de frecuencias de los valores de ED₅₀ mostró que el 100% de los aislados de *M. perniciosa* eran muy sensibles (ED₅₀ < 0,5 µg ml⁻¹) a los fungicidas carbendazima, procloraz-Mn y tiabendazol, presentando diferencias significativas con los valores de ED₅₀ de iprodiona y metil-tiofanato. Los valores de ED₅₀ para iprodiona oscilaban entre 1,897 y 3,805 µg ml⁻¹, por lo que todos los aislados resultaron débilmente resistentes a este fungicida (ED₅₀ = 1-10 µg ml⁻¹). Por último, los valores de ED₅₀ para el metil-tiofanato también mostraron un amplio rango (0,298-1,884 µg ml⁻¹), con dos aislados débilmente resistentes (ED₅₀ > 1 µg ml⁻¹), y los otros diez sensibles (ED₅₀ < 1 µg ml⁻¹).

Ensayos en cámaras de cultivo de champiñón

En la Tabla 2 se muestra la efectividad de los cinco fungicidas ensayados para controlar la mole húmeda en dos ciclos de cultivo de *A. bisporus* infectados artificialmente con dos dosis de inóculo de *M. pernicioso* diferentes (10^6 y 10^7 esporas m^{-2}). En los dos ensayos realizados únicamente se observó como síntoma típico de mole húmeda, la presencia de masas de tejido deformes sin ningún signo de diferenciación. En el ensayo A, los primeros síntomas se registraron 18 días después de la inoculación de la mezcla de cobertura (Día 20), coincidiendo con los primeros champiñones. En el ensayo B, los primeros síntomas de mole húmeda se observaron 17 días después de la inoculación de la cobertura (Día 19), y los primeros champiñones se cosecharon un día después (Día 20).

Los resultados obtenidos en el ensayo A no presentaron diferencias significativas en cuanto a la efectividad entre los tratamientos fungicidas aplicados. En el control inoculado, el peso total de moles húmedas recogido ascendió a $6,33 \text{ kg m}^{-2}$ (29,06% de la cosecha total), mientras que los tratamientos fungicidas con más moles húmedas, es decir, los menos eficaces, fueron el de carbendazima BI ($0,51 \text{ kg m}^{-2}$, 2,27%) e iprodiona BI ($0,35 \text{ kg m}^{-2}$, 1,79%). Por el contrario, la efectividad fue del 100% a lo largo de todo el ciclo de cultivo para los tratamientos procloraz-Mn AI, tiabendazol y metil-tiofanato aplicados antes y después de la inoculación.

En el ensayo B, se apreciaron diferencias significativas en la efectividad total entre iprodiona (BI y AI) y el resto de tratamientos ensayados. En el control inoculado, el peso total de moles húmedas recogido ascendió a $19,92 \text{ kg m}^{-2}$ (89,0% de la cosecha total), mientras que los tratamientos fungicidas con más moles húmedas fueron iprodiona BI ($13,90 \text{ kg m}^{-2}$, 64,20%) e iprodiona AI ($13,85 \text{ kg m}^{-2}$, 65,65%), que demostraron ser los menos efectivos a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Por el contrario, con los fungicidas carbendazima y metil-tiofanato aplicados después de la inoculación se consiguió un 100% de efectividad. En el resto de tratamientos, se puede ver como la efectividad disminuye conforme avanza el ciclo de cultivo. Para un mismo fungicida, no se observaron diferencias significativas entre la aplicación previa a la inoculación con *M. pernicioso* (día 0) y la aplicación posterior (día 5). En líneas generales, el tratamiento que presentó una mayor efectividad en los dos ensayos fue el metil-tiofanato aplicado después de la inoculación con *M. pernicioso*.

En cuanto al efecto de los fungicidas sobre la producción de champiñón evaluada mediante la eficiencia biológica (EB) (Tabla 3), se observó una mayor productividad en el ensayo A que en el B, lo que puede ser debido a diferencias en la calidad de los sustratos de cultivo utilizados. En el ensayo A, los resultados más bajos se obtuvieron con iprodiona, mientras que la EB fue más elevada con carbendazima y tiabendazol, este último incluso mejoró la productividad del control no inoculado. Por el contrario, en el ensayo B, el control inoculado tuvo mayor EB que el no inoculado, y los tratamientos con iprodiona fueron los que presentaron valores más altos de EB.

DISCUSIÓN

Los experimentos *in vitro* mostraron que el procloraz-Mn y la carbendazima eran los fungicidas más efectivos para inhibir el crecimiento de *M. pernicioso*, mientras que la iprodiona era el menos efectivo. Potocnik *et al.* (2008) obtuvieron resultados parecidos con aislados de *M. pernicioso* de Serbia: valores de ED₅₀ por debajo de 0,008 mg l⁻¹ para procloraz-Mn, y 0,46 y 4,08 mg l⁻¹ para benomilo e iprodiona, respectivamente. Los valores de ED₅₀ y factores de resistencia obtenidos (Tabla 1) indicaron que existe un riesgo muy bajo de que *M. pernicioso* desarrolle resistencia a los fungicidas ensayados.

La concentración de inóculo usada en la inoculación de la mezcla de cobertura en el ensayo A (10⁶ esporas m⁻²) estaba situada dentro de los rangos considerados como aceptables para la experimentación con hongos micopatógenos de champiñón (Mamoun *et al.*, 1995). Sin embargo, la escasa manifestación de la mole húmeda hizo que estos resultados fueran inconsistentes en lo que a control de la enfermedad se refiere, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Por el contrario, en el ensayo B, con una tasa de inóculo más elevada (10⁷ esporas m⁻²), sí hubo una mayor manifestación de la enfermedad, lo que permitió establecer diferencias significativas entre los tratamientos. Este último ensayo puso de manifiesto la escasa eficacia de la iprodiona frente al resto de fungicidas, lo que está en concordancia con los valores de ED₅₀ obtenidos en los experimentos *in vitro*.

Los datos recogidos en nuestros ensayos detectaron una leve disminución de eficacia durante la tercera florada en los tratamientos con carbendazima BI, tiabendazol BI y AI, procloraz-Mn AI y metil-tiofanato BI. Esta pérdida de eficacia de los fungicidas a lo largo del ciclo de cultivo de champiñón ha sido estudiada por varios autores. Fletcher *et al.* (1980) indicaron que una falta de control del patógeno del champiñón mediante benomilo (benomilo y metil-tiofanato se transforman en carbendazima) estaba asociada con la desaparición del fungicida de la cobertura antes de que empezara la cosecha, debido a la presencia en la mezcla de cobertura de bacterias capaces de degradar el benomilo. Posteriormente, Grogan y Jukes (2003) demostraron que la concentración de carbendazima en la parte superior de la capa de cobertura descendía rápidamente al final de la segunda florada, por lo que podía ser menos eficaz en la tercera florada, mientras que la concentración de tiabendazol permanecía elevada durante el periodo de cosecha, descendiendo hacia el día 35 después de la cobertura. En cuanto al procloraz, Grogan y Jukes (2003) demostraron que la concentración de procloraz desciende significativamente hacia el día 21, al final de la primera florada. Hay evidencias que sugieren que la concentración de procloraz en la capa de cobertura puede declinar significativamente durante el periodo de cultivo hasta llegar a ser menor del 20% de lo que se había aplicado, debido a que los microorganismos presentes en los materiales de cobertura son capaces de degradar la molécula del procloraz (Grogan *et al.*, 2008).

En líneas generales, los valores de eficiencia biológica (EB) obtenidos en el ensayo A fueron más elevados que los del B, probablemente debido a diferencias en la calidad de los sustratos usados. Únicamente el tratamiento con iprodiona AI tuvo valores de EB

iguales en los dos ensayos. En el ensayo A, los tratamientos aplicados con iprodiona, procloraz-Mn y metil-tiofanato tuvieron diferencias significativas con el control no inoculado, presentando una menor EB. Por el contrario, en el ensayo B el control inoculado y los tratamientos con iprodiona mostraron una mejor EB que el resto de tratamientos. El incremento en la tasa de inoculación con respecto al ensayo A favoreció una mayor manifestación de la enfermedad y un número mayor de moles húmedas. Como resultado, los tratamientos que tuvieron el menor efecto sobre la enfermedad obtuvieron un mayor número y peso de moles húmedas que los otros tratamientos, lo que proporcionó valores más elevados de EB. Los tratamientos más efectivos en el control de la mole húmeda no mejoraron la EB de *A. bisporus*.

El uso de fungicidas continúa siendo de utilidad en aquellos casos donde los patógenos todavía son sensibles, pero esto requiere un seguimiento regular de las poblaciones del patógeno, con el fin de valorar la aparición de posibles resistencias. Aunque el riesgo de que *M. pernicioso* desarrolle resistencia a los fungicidas ensayados es muy bajo, es necesario poner en práctica aquellas estrategias que reducen la incidencia de la mole húmeda, como es la estricta higiene de la explotación, ya que es imprescindible minimizar los riesgos de aparición de estas resistencias.

REFERENCIAS

- ABBOTT, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- BRADY, B.L.K., GIBSON, I.A.S. (1976). *Mycogone pernicioso*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n° 499. London, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- FINNEY, D.J. (1971). Probit analysis. University Press. Cambridge, UK.
- FLETCHER, J.T., GANNEY, G.W. (1968). Experiments on the biology and control of *Mycogone pernicioso* Magn. *Mushroom Science* **VII**: 221-237.
- FLETCHER, J.T., GAZE, R.H. (2008). Mushroom pest and disease control. Manson Publishing. London, UK. 192 pp.
- FLETCHER, J.T., DRAKES, G.D., TALENT, C.J.W. (1975). The control of wet bubble disease of mushrooms caused by *Mycogone pernicioso*. *Ann. Appl. Biol.* **79**: 35-41.
- FLETCHER, J.T., CONNOLLY, G., MOUNTFIERLD, E.I., JACOBS, L. (1980). The disappearance of benomyl from mushroom casing. *Ann. Appl. Biol.* **95**: 73-82.
- FLETCHER, J.T., HIMS, M.J., HALL, R.J. (1983). The control of bubble diseases and cobweb disease of mushrooms with prochloraz. *Plant Pathology* **32**: 123-131.
- FLETCHER, J.T., JAFFE, B., MUTHUMEENAKSHI, S., BROWN, A.E., WRIGHT, D.M. (1995). Variations in isolates of *Mycogone pernicioso* and in disease symptoms in *Agaricus bisporus*. *Plant Pathology* **44**: 130-140.
- GANDY, D.G., SPENCER, D.M. (1978). Fungicides for the control of *Mycogone pernicioso* (Magn.), the cause of wet bubble on the cultivated mushroom. *Scientia Horticulturae* **8**: 307-313.

- GEA, F.J., PARDO, A., NAVARRO, M.J., PARDO, J. (1995). Fungal diseases of mushroom culture from Castilla-La Mancha (Spain): incidence of *Verticillium fungicola*. In: Elliot, T.J. (Ed.), Science and cultivation of edible fungi: Mushroom Science XIV, Vol. 2. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, pp. 643-651.
- GROGAN, H.M., JUKES, A.A. (2003). Persistence of the fungicides thiabendazole, carbendazim and prochloraz-Mn in mushroom casing soil. *Pest Manag. Sci.* **59**: 1225-1231.
- GROGAN, H., PAPADOPOULOS, G., BENDING, G.D., WOOD, M. (2008). Microbial degradation of prochloraz in mushroom casing. In: Van Gruening, M. (Ed.), Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, South African Mushroom Farmers Association, Pretoria, South Africa, pp. 364-372. (CD-ROM).
- HOLLAND, D.M., COOKE, R.C. (1990). Activation of dormant conidia of the wet bubble pathogen *Mycogone perniciosa* by Basidiomycotina. *Mycol. Res.* **94**(6): 789-792.
- MAMOUN, M., OLIVIER, J.M. (1995). Discussions on assessment of artificial infections with *Verticillium fungicola* for breeding programmes. In: Elliot, T.J. (Ed.), Science and cultivation of edible fungi: Mushroom Science XIV, Vol. 2. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, pp. 669-677.
- POTOCNIK, I., MILIJASEVIC, S., REKANOVIC, E., TODOROVIC, B., STEPANOVIC, M. (2008). Sensitivity of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Cladobotryum* spp. to fungicides in Serbia. In: Van Gruening, M. (Ed.), Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, South African Mushroom Farmers Association, Pretoria, South Africa, pp. 615-627. (CD-ROM).
- ROBERTSON, J.L., PREISLER, H.K., RUSSELL, R.M. (2003). Polo Plus. Probit and logit analysis. User's guide. LeOra Software, Petaluma, CA, USA. 36 pp.
- VINCENT, J.M. (1947). Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* **159**, 850.
- ZARE, R., GAMS, W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycol. Res.* **112**: 811-824.

Tabla 1. Valores de ED₅₀ de los fungicidas seleccionados y factores de resistencia de los aislados de *Mycogone perniciososa* recolectados entre los años 2006 y 2009 en España.

Fungicida	Aislados	ED ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Factor de resistencia ^b
		Media ^a	Rango	
Carbendazima	12	0,065 a	0,031-0,097	1,49
Iprodiona	12	2,678 c	1,897-3,805	1,42
Procloraz-Mn	12	0,029 a	0,006-0,064	2,20
Tiabendazol	12	0,225 a	0,155-0,335	1,49
Metil-tiofanato	12	0,773 b	0,298-1,884	2,44

^aMedias en columna seguidas por distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey HSD, al nivel P = 0,05.

^bEl factor de resistencia se expresa como la relación entre el valor más elevado de ED₅₀ de los aislados considerados, frente al valor medio de ED₅₀ para cada combinación de aislados-fungicida.

Tabla 2. Eficacia (%) de los fungicidas carbendazima, iprodiona, prochloraz-Mn, tiabendazol y metal-tiofanato en el control de *Mycogone perniciosa* en dos ciclos de cultivo de *A. bisporus* infectados artificialmente con el patógeno.

Fungicida y momento de aplicación	Ensayo A (10^6 spores m^{-2})				Ensayo B (10^7 spores m^{-2})			
	1 ^a flor	2 ^a flor	3 ^a flor	Total	1 ^a flor	2 ^a flor	3 ^a flor	Total ^a
Carbendazima BI	97,4	99,2	89,7	97,8	100,0	100,0	92,9	97,6 b
Iprodiona BI	100,0	91,3	100,0	96,5	56,6	27,2	4,9	20,5 a
Prochloraz-Mn BI	98,3	98,3	100,0	98,8	99,2	96,7	96,6	98,1 b
Tiabendazol BI	100,0	100,0	100,0	100,0	97,7	94,6	74,7	92,6 b
Metil-tiofanato BI	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,1	94,8	97,9 b
Carbendazima AI	100,0	99,4	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0 b
Iprodiona AI	98,5	97,6	100,0	98,9	69,4	8,5	6,8	24,4 a
Prochloraz-Mn AI	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,1	87,8	97,0 b
Tiabendazol AI	100,0	100,0	100,0	100,0	94,4	91,0	80,9	88,7 b
Metil-tiofanato AI	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 b

^aMedias en columna seguidas por distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey HSD, al nivel P = 0,05.

Tabla 3. Efecto de los fungicidas sobre la producción de champiñón, evaluada mediante la eficiencia biológica (EB), en cultivos de *A. bisporus* infectados artificialmente con *M. perniciosa*.

Fungicida y momento de aplicación		Ensayo A (10 ⁶ spores m ⁻²) ^a	Ensayo B (10 ⁷ spores m ⁻²)
	Control (no inoculado)	115,16 abc	90,26 ab
	Control (inoculado)	110,08 abc	99,65 ab
Aplicado 2 días antes de la inoculación (día 0)	Carbendazima BI	113,69 abc	86,94 ab
	Iprodiona BI	99,03 a	102,60 b
	Procloraz-Mn BI	104,70 ab	81,73 a
	Tiabendazol BI	120,78 c	90,38 ab
	Metil-tiofanato BI	103,47 ab	83,98 a
		Carbendazima AI	105,40 abc
Aplicado 3 días después de la inoculación (día 5)	Iprodiona AI	97,93 a	97,92 ab
	Procloraz-Mn AI	101,06 ab	93,05 ab
	Tiabendazol AI	115,89 bc	92,08 ab
	Metil-tiofanato AI	103,47 ab	82,69 a

^aMedias en columna seguidas por distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey HSD, al nivel P = 0,05.

Eficacia del té de compost elaborado con sustratos post-cultivo de hongos comestibles sobre la mole seca (*Verticillium fungicola*)

F.J. Gea¹, M.C. Lainez², M.J. Navarro¹, M. Santos³ y J.C. Tello³

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

²IES Amparo Sanz. Albacete. ³Dpto. de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Almería.

INTRODUCCIÓN

El agente causal de la mole seca y principal hongo micoparásito del champiñón es *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk (Gams y Van Zaayen, 1982), recientemente clasificado como *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams (Zare y Gams, 2008). La mole seca es la enfermedad fúngica más común y grave de los cultivos de champiñón, ya que si no se controla puede llegar a destruir por completo una cosecha en dos o tres semanas, haciendo inviable económicamente el cultivo (Fletcher y Gaze, 2008). Esta afirmación está corroborada por las numerosas publicaciones que señalan a esta enfermedad como la más destructiva y ubicua en prácticamente todos los países productores de champiñón (Sinden, 1971; Gandy, 1972; Harvey *et al.*, 1982; Geels *et al.*, 1988; Rinker y Wuest, 1994; Largeteau *et al.*, 2004). En España, Gea y Tello (1997) valoraron la incidencia de la mole seca en los cultivos de champiñón castellano-manchegos, constatando su elevada magnitud y persistencia.

Debido a la gravedad de los daños producidos por esta enfermedad, se han aplicado contra *V. fungicola* todos los medios que la técnica ponía al alcance de los cultivadores, entre éstos hay que destacar la aplicación de fungicidas benzimidazoles y tiofanatos (Bollen y Van Zaayen, 1975; Fletcher y Yarham, 1976), técnicas profilácticas de aislamiento como las preconizadas por Atkins y Atkins (1971), Munns (1975), y Harvey (1982), e intentos de control biológico con preparados a base de *Trichoderma* (De Trogoff y Ricard, 1976; Olivier, 1983).

Con la introducción del fungicida procloraz en 1983 para combatir a *V. fungicola*, se logró alcanzar un buen control sobre el patógeno, baste señalar que el procloraz conseguía reducir la incidencia de la enfermedad en un 87%, al tiempo que aumentaba significativamente la cosecha de champiñones sanos (Fletcher, 1981; Gandy y Spencer, 1981). Tanto Van Zaayen y Van Adrichem (1982), como d'Hardemare (1983) y Fletcher *et al.* (1983), consideraron que el procloraz era un fungicida eficaz para el control de varios hongos patógenos del champiñón (*Cladobotryum dendroides*, *Mycogone pernicioso*, *Verticillium fungicola*). Posteriormente, Gea *et al.* (1996) encontraron que el procloraz-Mn era más eficaz frente a *V. fungicola* que los fungicidas benomilo, clortalonil, formaldehído, iprodiona y procloraz + carbendazima.

El amplio uso del procloraz ha provocado un descenso en la sensibilidad de *V. fungicola* a este fungicida. No obstante, todavía proporciona un razonable grado de control de la mole seca, pero por un periodo de tiempo cada vez menor (Fletcher y Gaze, 2008). Por el

momento, no se ha demostrado concluyentemente la resistencia de aislados de *V. fungicola*, aunque sí hay evidencias de estudios *in vitro* que apuntan a este descenso de sensibilidad (Geels, 1996; Desrumeaux *et al.*, 1998; Grogan *et al.*, 2000; Gea *et al.*, 2005). Por otro lado, también hay que tener en cuenta que la concentración de procloraz al final de la segunda florada desciende considerablemente, ya que tiene una persistencia relativamente corta (Grogan y Jukes, 2003), fenómeno que está relacionado con una degradación microbiana del fungicida (Grogan *et al.*, 2008). La suma de ambas evidencias: el descenso de la sensibilidad observada en aislados de *V. fungicola* y la menor persistencia del procloraz, ofrecen como resultado una protección más corta de los cultivos de champiñón frente a la enfermedad de la mole seca. Por tanto, en estos momentos, los cultivadores de champiñón no pueden confiar exclusivamente en este fungicida como única estrategia de control de la mole seca.

Ante esta situación, hay varias razones que conducen al estudio sobre la utilización del té de compost elaborado con sustrato post-cultivo de hongos comestibles como método de control biológico de la mole seca: en primer lugar, la utilización de té de compost de coproductos agrícolas se sitúa entre los métodos de biocontrol sugeridos como alternativa a los productos químicos en el control de hongos fitopatógenos foliares (Weltzein 1991; Scheuerell y Mahaffee 2002); en segundo lugar, los resultados que refleja la bibliografía consultada son alentadores (Yohalem *et al.* 1994, Dianez *et al.* 2006), al igual que los datos obtenidos en ensayos *in vitro* (Gea *et al.* 2009); y por último, la proximidad y fácil disponibilidad de estos sustratos también es un factor a tener en cuenta, ya que en nuestra área de cultivo se recogen anualmente 200.000 toneladas de sustrato post-cultivo de hongos comestibles.

En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos sobre la eficacia *in vitro* del té de compost no aireado, elaborado con sustratos post-cultivo de hongos comestibles, frente a *V. fungicola*; los resultados sobre el efecto fitotóxico que tiene este té de compost sobre el micelio de champiñón; y los resultados sobre la eficacia del té de compost para controlar la mole seca en cultivos de champiñón infectados artificialmente con *V. fungicola*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Eficacia *in vitro* del té de compost frente a *V. fungicola*

El material de partida utilizado fue sustrato post-cultivo de hongos comestibles (SPCH), elaborado en una proporción del 60% de SPCH de *Agaricus* y 40% de SPCH de *Pleurotus* (Recomsa, Quintanar del Rey, Cuenca, España), mezclado con turba rubia (Klasmann, Valimex, Palleter, España) en una proporción 1:1 (v/v) y corregido con carbonato cálcico. Se ensayaron las diluciones 1:4 y 1:8 (p/v) de compost y agua. Los tiempos de extracción utilizados fueron de 1, 7 y 14 días. Estas mezclas se incubaron sin agitación, a 20 °C, durante el tiempo requerido. Posteriormente, se filtraron a través de dos capas de muselina.

Con los seis tes de compost obtenidos se prepararon tres medios de cultivo distintos, usando agar-agua 1,5% como medio básico (1/1, v/v). El primero de ellos (F) se

elaboró con agar-agua y el té de compost sin tratamiento, sólo filtrado; el segundo (E) se hizo con agar-agua y el té de compost previamente autoclavado (20 minutos a 121 °C); y el tercero (M) con agar-agua más el té de compost microfiltrado (M), primero con un prefiltro de 25 µm y posteriormente a través de filtros Millex[®] de 0,22 µm. También se preparó un control con agar-agua 1,5% y agua estéril (1:1, v/v), y un control positivo (P) con el mismo agar y el fungicida procloraz 46% en complejo manganeso (1:1, v/v) (Sporgon[®], AgrEvo, Valencia, España) con una concentración final de 50 ppm. Se utilizaron 3 aislados de *V. fungicola* var. *fungicola* en todas las situaciones ensayadas. Las placas de Petri con los citados medios de cultivo se sembraron con discos de 5 mm de micelio de *V. fungicola* y se incubaron durante 12 días a 20 °C, transcurridos los cuales se midieron dos diámetros perpendiculares de los crecimientos miceliares (Weltzien, 1991; McQuilken *et al.*, 1994). Se realizaron 5 repeticiones y el experimento se hizo por duplicado.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PI) del micelio de *V. fungicola* en cada uno de los tratamientos ensayados, calculado mediante la ecuación de Vincent (1947): $PI = 100(C-T)/C$, en donde *C* es la tasa de crecimiento en el control con agua estéril, y *T* es la tasa de crecimiento en los tratamientos con té de compost. Los valores medios se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el test de Tukey-HSD ($P = 0,05$) para la separación de medias. Los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics[®] Plus v. 4.1.

Ensayos realizados *in vivo* en cámara de cultivo de champiñón

Elaboración del té de compost

El material de partida utilizado fue sustrato post-cultivo de champiñón tratado con vapor a 70 °C durante 12 horas, con el fin de eliminar cualquier organismo patógeno, y posteriormente sometido a un proceso de recompostaje controlado durante 57 días.

Con este material se elaboraron los tes de compost aireados utilizados en los ensayos que se describen a continuación. Para ello, se preparó una mezcla de compost/agua en dilución 1:4 (p/v). La mezcla se agitó en agitador orbital a 150 rpm a 25 °C y durante el tiempo de extracción de 1 día. Posteriormente se filtró por muselina para eliminar el exceso de materia de gran tamaño.

Efecto fitotóxico del té de compost sobre el micelio de champiñón

Para valorar el efecto fitotóxico de los tes de compost sobre el micelio de champiñón se realizó un ciclo de cultivo en una cámara visitable Ibercex (ASL, S.A., San Fernando de Henares, Madrid, España) de dimensiones 3,70 x 2,10 x 2,60 m (20,2 m³), provista de sistemas de humidificación, calefacción/refrigeración, y recirculación/ventilación exterior, que permite el control automático de la temperatura, la humedad relativa y la concentración de dióxido de carbono. Se utilizaron 20 cubetas, con una superficie por cubeta de 870 cm², cada una de las cuales se llenó con 6 kg de compost. El compost se sembró con la variedad de micelio Gurelan 45. La mezcla de cobertura utilizada estaba formada por una mezcla de suelo mineral y turba rubia en proporción 4:1

(v/v), que es la habitual en el sector productor de Castilla-La Mancha. Las cubetas se situaron en dos alturas, a ambos lados de la cámara, siguiendo un diseño de bloques al azar con 5 repeticiones. El té de compost se aplicó en riego, el mismo día de su obtención, sobre la mezcla de cobertura, a razón de 1,2 litros por m². Se realizaron 3 tratamientos distintos: 1R: sólo una aplicación en el primer riego, el mismo día en que se aplica la mezcla de cobertura (día 0); 2R: dos aplicaciones, en primer y segundo riegos (días 0 y 2), y 3R: tres aplicaciones, en primero, segundo y tercer riegos (días 0, 2 y 6). Se utilizó un control en el que únicamente se aplicó agua. La conducción del ciclo se ajustó a las condiciones de cultivo indicadas en Navarro *et al.* (2004).

La fitotoxicidad de los tes de compost se valoró durante las tres primeras floradas, contrastando la producción de champiñón obtenida en cada tratamiento con la del control. Además, se ha calculado la precocidad de la cosecha en cada tratamiento, la cual se expresa como el tiempo que transcurre entre la aplicación de la mezcla de cobertura y la cosecha de la primera florada, ponderando la producción relativa diaria.

Eficacia del té de compost en cultivo de champiñón infectado artificialmente con *Verticillium fungicola*

Para valorar la eficacia del té de compost frente a *V. fungicola* se realizó un ciclo de cultivo en una cámara visitable, cuyas principales características ya han sido descritas en el apartado anterior. El día siguiente a la aplicación de la mezcla de cobertura (día 1), se realizó una inoculación con una dilución de esporas de *V. fungicola*, a razón de 10⁶ esporas/ml, aplicando 120 ml por m².

En este ensayo se utilizaron dos tes de compost distintos: uno de ellos se obtuvo a partir de un sustrato post-cultivo de champiñón en el que se utilizó como mezcla de cobertura suelo mineral y turba rubia en proporción 4:1 (v/v), denominado “suelo mineral”; mientras que el otro se obtuvo a partir de un sustrato con una cobertura a base de turba, tipo Topterra[®], al que denominamos “turba”. Los tratamientos con té de compost se aplicaron a razón de 1,2 litros por m², y los momentos de aplicación fueron los siguientes: el primer riego (1) se aplicó el mismo día de la cobertura (día 0), el segundo riego (2) tres días después de cubrir (día 3), y el tercer riego (3) siete días después de cubrir (día 7). Se utilizaron tres controles: un control inoculado con esporas de *V. fungicola*, en el que los riegos se realizaron sólo con agua (CI); otro control también inoculado al que se le aplicó el fungicida procloraz en el tercer riego (P); y un control puro (C), sin inocular y regado sólo con agua. El diseño experimental fue de bloques al azar con 6 repeticiones.

La eficacia del té de compost frente a *V. fungicola* se valoró durante las tres primeras floradas (F1, F2 y F3), contrastando la producción de champiñón sano y de champiñón con *V. fungicola* obtenida en cada tratamiento, con la producción obtenida en los controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia *in vitro* del té de compost frente a *V. fungicola*

La Tabla 1 muestra el porcentaje medio de inhibición del crecimiento del micelio para los tres aislados de *V. fungicola* expuestos a los tratamientos con los tes de compost y el fungicida procloraz 46%. Los datos se presentan agrupados, mostrando el comportamiento conjunto de los aislados de *V. fungicola* en cada uno de los tres medios de cultivo preparados con té de compost (F, E y M) y con el fungicida procloraz. Asimismo, la Tabla 1 también muestra el efecto de los tiempos de extracción usados (1, 7 y 14 días) para obtener los tes de compost, y el efecto de las dos diluciones de compost y agua ensayadas, sobre el crecimiento miceliar de *V. fungicola*.

El porcentaje de inhibición del micelio fue más bajo en los tes de compost microfiltrados (M) y autoclavados (E), con un 7 y 11,5%, respectivamente; mientras que el tratamiento con té de compost filtrado (F) alcanzó un porcentaje de inhibición del 96%, superior incluso al del fungicida procloraz (P) (95%). Estos resultados indican que los tes de compost obtenidos mediante los procesos de autoclavado y microfiltración pierden buena parte de su actividad, por lo que tienen poco efecto sobre el crecimiento del micelio, lo que sugiere que la inhibición se produce sobre todo por la presencia de microorganismos en los extractos acuosos, que compiten por los nutrientes y el espacio (Weltzien, 1991). Por tanto, procesos tales como la microfiltración y la esterilización mediante calor, eliminan estos microorganismos de los tes de compost, lo que disminuye su efectividad en la supresión de la enfermedad (Scheuerell y Mahaffee, 2002). Sin embargo, Yohalem *et al.* (1994) afirmaban que los extractos acuosos elaborados con compost agotado de champiñón, y fermentados anaeróbicamente, mantenían sus propiedades inhibitorias después del autoclavado y de la microfiltración, e incluso mantenían su efecto sobre la germinación de conidios de *Venturia inaequalis* durante al menos cuatro meses, cuando se almacenaban a -20 °C, a 4 °C y a temperatura ambiente. Diáñez *et al.* (2006) también obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento para *V. fungicola* y *V. dahliae* de hasta el 60%, usando té de compost de orujo de uva microfiltrado e incubado durante un día.

Como se puede ver en la Tabla 1, los mejores resultados se obtienen con 1 y 7 días de tiempo de extracción, mientras que Diáñez *et al.* (2006) obtuvieron el 100% de inhibición del crecimiento micelial de *V. fungicola* con dos semanas de extracción. En este sentido, varios estudios han indicado que la supresión de la enfermedad varía ampliamente en relación con el tiempo de fermentación empleado, ya que la supresión aumenta con tiempos de fermentación más amplios hasta alcanzar un nivel máximo, a partir del cual declina (Scheuerell y Mahaffee, 2002). A este respecto, Weltzien (1991) sugirió que son necesarios entre 5 y 16 días de tiempo de extracción para alcanzar cualquier nivel de control de la enfermedad, aunque el tiempo de fermentación ideal tiene que ser determinado para cada combinación huésped-patógeno-tipo de compost utilizado (Scheuerell y Mahaffee, 2002).

En cuanto a las diluciones utilizadas, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, y en ambos casos se obtuvieron porcentajes de inhibición elevados. Scheuerell & Mahaffee (2002) señalaron que no estaba claro como incide la

relación compost:agua en la supresión de la enfermedad, y situaban como dilución límite la de 1:10.

Efecto fitotóxico del té de compost sobre el micelio de champiñón

Las producciones obtenidas en los diferentes tratamientos quedan reflejadas en la Tabla 2. Se observa un pequeño descenso de producción (4%) en las cubetas en que se ha aplicado un primer riego con los tes de compost, y este descenso se agudiza conforme se incrementa el número de riegos, llegando incluso al 10% de la producción cuando se aplican tres riegos con té de compost. Este hecho puede estar relacionado con la elevada conductividad eléctrica que presentan los tes de compost [conductividad eléctrica₂₅ 1:10 (p_{seco}/v): 4.910-5.470 $\mu\text{S}/\text{cm}$], que pueden incrementar, a su vez, la conductividad de la mezcla de cobertura, lo que dificulta la fructificación del champiñón (Pardo *et al.* 2004).

En cuanto a la precocidad, se observa un ligero retraso (1 día) con respecto al control, en el inicio de la cosecha de la primera florada para todos los tratamientos en que se ha utilizado el té de compost, independientemente del número de aplicaciones que se hayan realizado.

Eficacia del té de compost en cultivo de champiñón infectado artificialmente con *Verticillium fungicola*

Las producciones de champiñón sano obtenidas en los diferentes tratamientos quedan reflejadas en la Figura 1. Como era de esperar, la producción más baja se ha registrado en el control inoculado con esporas de *V. fungicola* (CI), con 9,36 kg/m^2 , mientras que la más elevada se ha recogido en el control puro (C), con 16,86 kg/m^2 . En líneas generales, se puede observar que las producciones de los tratamientos con té de compost a base de turba son mejores (12,71-14,35 kg/m^2) que las registradas para los tratamientos con té de compost a base de suelo mineral (9,77-12,32 kg/m^2). También hay que destacar, que las producciones recogidas en todos los tratamientos con té de compost a base de turba y en el tratamiento 23 con té de compost a base de suelo mineral, son más elevadas que las obtenidas en el control con procloraz (11,19 kg/m^2).

En la Figura 2, se muestran las producciones de champiñón con *V. fungicola* obtenidas en los diferentes tratamientos. En esta ocasión, el control inoculado con esporas de *V. fungicola* (CI) es el que registra una mayor producción de champiñón con *V. fungicola* (8,26 kg/m^2), mientras que en el control puro casi ni se aprecia la aparición de mole seca (0,1 kg/m^2). Las producciones de champiñón con *V. fungicola* recogidas en los tratamientos con té de compost a base de turba son más bajas (2,45-4,51 kg/m^2) que las registradas para los tratamientos con té de compost a base de suelo mineral (3,80-6,18 kg/m^2). En ambos casos, las cifras son menores que en el caso del control inoculado. Al comparar los resultados obtenidos en los tratamientos con tes de compost, con los obtenidos para el tratamiento con procloraz (P) (6,09 kg/m^2), se puede ver que en este último hay una mayor producción de champiñón con *V. fungicola*, con la excepción del

tratamiento 1 del té de compost con suelo mineral. Es decir, la aplicación de riegos con té de compost, sobre todo el elaborado con turba, permite un control de la mole seca más eficaz que el que proporciona la aplicación del fungicida procloraz. También se puede ver como la aplicación de riegos con té de compost en los días más próximos a la cosecha (riegos 2 y 3) favorecen el control de la mole seca.

Por tanto, teniendo en cuenta que el efecto fitotóxico registrado con los tes de compost no es muy pronunciado, y que la eficacia en el control de *V. fungicola* es incluso superior a la manifestada por el fungicida procloraz, se puede considerar el uso de té de compost elaborado con sustratos de hongos comestibles como una alternativa biológica en el control de la mole seca.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto RTA2010-00011-C02-01 cofinanciado por INIA y FEDER.

REFERENCIAS

- ATKINS, P. y ATKINS, F.C. (1971). Major diseases of the cultivated white mushroom *Agaricus bisporus* var. *albidus*. *Mushroom Growers' Association Bull.* **260**: 361-382.
- BOLLEN, G.J. y Van ZAAYEN, A. (1975). Resistance to benzimidazole fungicides in pathogenic strains of *Verticillium fungicola*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **81**: 157-167.
- DESRUMEAUX, B., SEDEYN, P., WEBROUCK, A. y LANNOY, P. (1998). Résistance de la môle sèche au Sporgon (*Verticillium fungicola* var. *fungicola*). *Le Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricole de Cultivateurs de champignons* **77**: 677-681.
- De TROGOFF, H. y RICARD, J-L. (1976). Biological control of *Verticillium malthousei* by *Trichoderma viride* spray on casing soil in commercial mushroom production. *Plant Dis. Repr.* **60**: 677-680.
- D'HARDEMARE, G. (1983). Contrôle du *Verticillium fungicola* par le prochloraz sous diverses formulations. Comportement de diverses variétés. *Bulletin de la Fédération Nationale des Cultivateurs de Champignons* **20**: 586-590.
- DIÁNEZ, F., SANTOS, M., BOIX, A., DE CARA, M., TRILLAS, I., AVILÉS, M. y TELLO, J.C. (2006). Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: role of siderophores. *Compost Science & Utilization* **14**: 48-53.
- FLETCHER, J.T. (1981). The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Science* **XI**: 597-604.
- FLETCHER, J.T. y GAZE, R.H. (2008). Mushroom pest and disease control. London: Manson Publishing. 192 pp.
- FLETCHER, J.T., HIMS, M.J. y HALL, R.J. (1983). The control of bubble diseases and cobweb disease of mushrooms with prochloraz. *Plant Pathology* **32**: 123-131.

- FLETCHER, J.T. y YARHAM, D.J. (1976). The incidence of benomyl tolerance in *Verticillium fungicola*, *Mycogone pernicioso* and *Hypomyces rosellus* in mushroom crops. *Annals of Applied Biology* **84**: 343-353.
- GAMS, W. y Van ZAAYEN, A. (1982). Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. *Netherland Journal of Plant Pathology* **88**: 57-78.
- GANDY, D.G. (1972). Observations on the development of *Verticillium malthousei* in mushroom crops and the role of cultural practices in its control. *Mushroom Science* **VIII**: 171-181.
- GANDY, D.G. y SPENCER, D.M. (1981). Fungicide evaluation for control of dry bubble, caused by *Verticillium fungicola*, on commercial mushroom strains. *Scientia Horticulturae* **14**: 107-115.
- GEA, F.J., NAVARRO, M.J. y TELLO, J.C. (2005). Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese in vitro. *Mycological Research* **109**: 741-745.
- GEA, F.J., NAVARRO, M.J. y TELLO, J.C. (2009). Potential application of compost teas of agricultural wastes in the control of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **116**: 271-273.
- GEA, F.J. y TELLO, J.C. (1997). *Micosis del cultivo del champiñón*. Coedición Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Spain.
- GEA, F.J., TELLO, J.C. y HONRUBIA, M. (1996). *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* **136**: 133-137.
- GEELS, F.P. (1996). Gevoeligheid voor Sporgon van recent geïsoleerde stammen van *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *De Champignoncultuur* **40**: 401-406.
- GEELS, F.P., Van DE GEIJN, J. y RUTJENS, A.J. (1988). Pests and diseases. In: *The cultivation of mushrooms*. Van Griensven, L.J.L.D. (Ed.). Interlingua. Sussex. 361-422 pp.
- GROGAN, H.M. y JUKES, A.A. (2003). Persistence of the fungicides thiabendazole, carbendazim and prochloraz-Mn in mushroom casing soil. *Pest Management Science* **59**: 1225-1231.
- GROGAN, H.M., KEELING, C. y JUKES, A.A. (2000). *In vivo* response of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* (dry bubble) to prochloraz-manganese. BCPC Conference – Pests & Diseases, Brighton, UK.
- GROGAN, H., PAPADOPOULOS, G., BENDING, G.D. y WOOD, M. (2008). Microbial degradation of prochloraz in mushroom casing. In: Van Gruening, M. (Ed.), *Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII*, South African Mushroom Farmers Association, Pretoria, South Africa, pp. 364-372. (CD-ROM).
- HARVEY, C.L. (1982). METHODS for control of *Verticillium* and *Mycogone*. *Mushroom News* **30**(11): 29-31.
- HARVEY, C.L., WUEST, P.J. y SCHISLER, L.C. (1982). Diseases, weed molds, indicator molds, and abnormalities of the commercial mushroom. In: Wuest, P.J. & G.D. Bengtson (Eds.), *Penn State handbook for commercial mushroom growers*. The Pennsylvania State University. 19-33 pp.
- LARGETEAU, M.L., MATA, G. y SAVOIE, J.M. (2004). *Verticillium fungicola* var. *fungicola* affects *Agaricus bisporus* cultivation in Mexico. *FEMS Microbiology Letters* **236**: 191-196.

- MCQUILKEN, M.P., WHIPPS, J.M. y LYNCH, J.M. (1994). Effects of water extracts of a composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *World J. Microb. Biot.* **10**: 20-26.
- NAVARRO, M.J., GEA, F.J. y FERRAGUT, F.J. (2004). Biología y control de *Brennandania lambi* en los cultivos de champiñón de Castilla-La Mancha. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 203 pp.
- MUNNS, P. (1975). The pot technique for the control of *Verticillium* and *Mycogone*. *Mushroom Journal* **29**: 154-156.
- OLIVIER, J.M. (1983). Recherches sur l'utilisation del *Trichoderma* dans la lutte contre les maladies du champignon de couche. In: *Faune et flore auxiliaire en agriculture*. Acta Paris. 219-222 pp.
- PARDO, A., NAVARRO, M.J., MOYA, M.J. y GEA, F.J. (2004). Uso del compost agotado de hongos cultivados reciclado como material de cobertura para el cultivo de champiñón. In: Sociedad Española de Agricultura Ecológica (Ed), *Agroecología: Referente para la transición de los sistemas agrarios*, 1.599-1.609.
- RINKER, D.L. y WUEST, P.J. (1994). Pests of commercial mushroom production: Fungal diseases. *Mushroom World* **5**(1): 25-34.
- SCHEUERELL, S. y MAHAFFEE, W. (2002). Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization* **10**: 313-338.
- SINDEN, J.W. (1971). Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathology* **9**: 411-432.
- VINCENT, J.M. (1947). Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* **159**: 850.
- Van ZAAYEN, A. y Van ADRICHEM, J.C.J. (1982). Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. *Netherlands Journal of Plant Pathogen* **88**: 203-213.
- WELTZIEN, H.C. (1991). Biocontrol of foliar fungal diseases with compost extracts. In: J.H. Andrews & S.S. Hirano (Eds), *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, 430-450.
- YOHALEM, D.S., HARRIS, R.F. y ANDREWS, J.H. (1994). Aqueous extracts of spent mushroom substrate for foliar disease control. *Compost Science & Utilization* **2**: 67-74.
- ZARE, R. y GAMS, W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research* **112**: 811-824.

Tabla 1. Efectos de los tratamientos con té de compost y del fungicida procloraz 46%, de los tiempos de extracción y de la dilución, sobre el crecimiento del micelio de tres aislados de *V. fungicola*.

		n	Media ± SD²
Efecto de los tratamientos con té de compost y del fungicida sobre el crecimiento miceliar de <i>V. fungicola</i>	F ¹	360	95,74 ± 9,79 c
	E ¹	360	11,51 ± 8,50 b
	M ¹	358	6,99 ± 8,33 a
	P ¹	360	95,34 ± 6,78 c
Efecto de los tiempos de extracción (días) sobre el crecimiento miceliar de <i>V. fungicola</i>	1	120	100,00 ± 0,0 b
	7	120	98,94 ± 16,19 b
	14	120	88,39 ± 13,81 a
Efecto de la dilución sobre el crecimiento miceliar de <i>V. fungicola</i>	1:4	180	96,12 ± 10,25
	1:8	180	95,37 ± 9,57

¹F: medio de cultivo preparado con 1.5% de agar-agua y té de compost filtrado (1:1, v/v); E: medio de cultivo preparado con 1.5% de agar-agua y té de compost autoclavado durante 20' a 121°C (1:1, v/v); M: medio de cultivo preparado con 1.5% de agar-agua y té de compost microfiltrado (1:1, v/v); P: medio de cultivo preparado con 1.5% de agar-agua y procloraz 46% en complejo manganeso (1:1, v/v).

²Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$), de acuerdo con el test de Tukey-HSD.

Tabla 2. Producción total de champiñón cosechado, en kg/m² (valor medio ± desviación estándar) y en porcentaje respecto al control, y precocidad (valor medio ± desviación estándar) para cada uno de los tratamientos con té de compost realizados.

Tratamiento	Producción		Precocidad (días)
	(kg/m²)	%	
Control	20,00 ± 1,80	100	21,07 ± 0,34
1R ¹	19,20 ± 2,55	96,00	21,86 ± 0,48
2R ¹	18,60 ± 1,59	93,00	21,87 ± 0,58
3R ¹	17,97 ± 1,30	89,85	22,08 ± 0,64

¹1R: una aplicación de té de compost en el primer riego; 2R: dos aplicaciones en primer y segundo riegos; 3R: tres aplicaciones, en primero, segundo y tercer riegos.

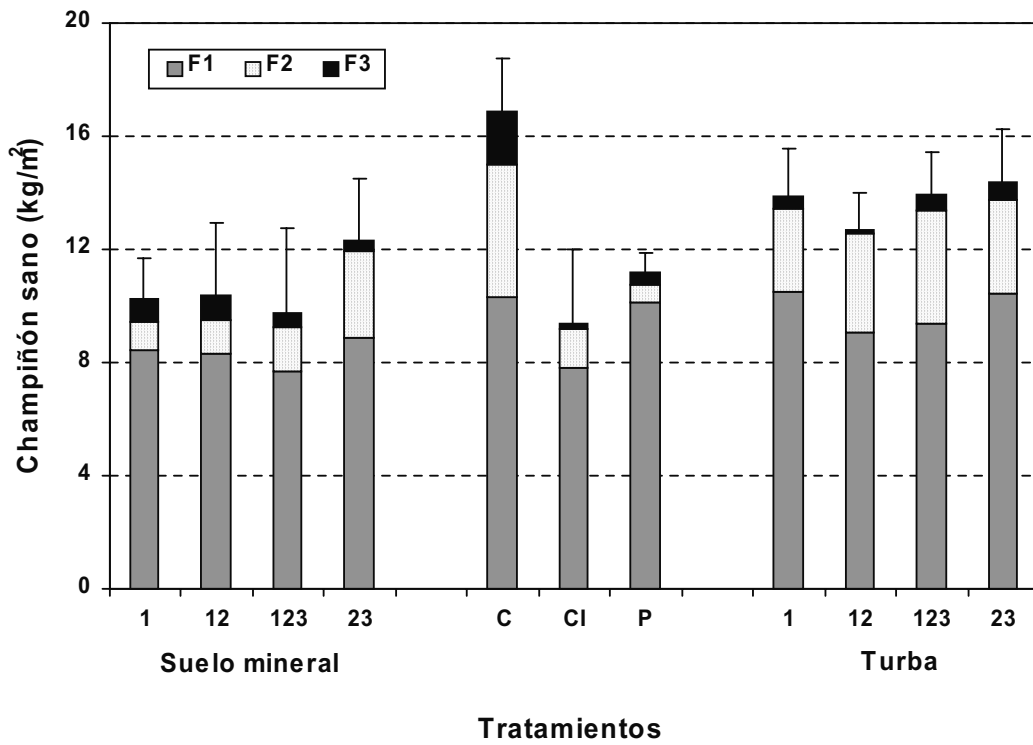


Figura 1. Producción de champiñón sano, en kg/m^2 , para cada uno de los tratamientos realizados.

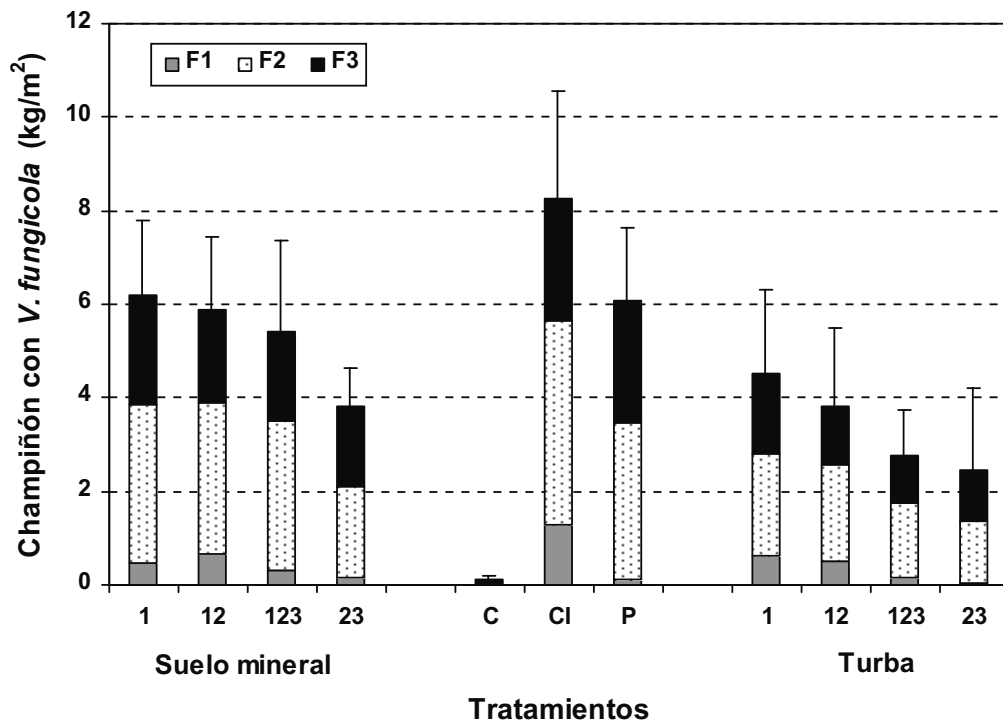


Figura 2. Producción de champiñón con *Verticillium fungicola*, en kg/m^2 , para cada uno de los tratamientos realizados.



EL CULTIVO DE LA TRUFA.

UNA ALTERNATIVA AGRÍCOLA-FORESTAL PARA CASTILLA LA MANCHA



Dr. Mario Honrubia
Catedrático de Biología Vegetal
Universidad de Murcia, Spain.



MICODIES



Grupos de Acción Local
Murcia (1)
Castilla la Mancha (3)
Andalucía (2)
Canarias (1)

Objectives:

- 1.- Valuation of mycological resources
- 2.- Develop strategies for sustainability of the mycological resources and their habitats

Training programme:

- Mycological Journeys (fair, exposures and talks)
- Training courses for Forest Agents and SEPRONA
- Truffle fairs

Dissemination programme:

- Web site, catalogues of fungi, children entertainments
- Tourism programme:
- Mycological itineraries
- rural lodgements and mycogastronomy




La Casa del Nizcalo




MICODIES

Grupos de Acción Local
Murcia (1)
Castilla la Mancha (3)
Andalucía (2)
Canarias (1)

**ACCIONES
TRANSVERSALES**





MICOTURISMO, con sus variantes:

- Turismo trufero y
- Mico-enoturismo



El micoturismo es un tipo de turismo que se centra en el consumo de setas comestibles. Este tipo de turismo se ha desarrollado en los últimos años, especialmente en zonas rurales y de montaña. El micoturismo puede ser una actividad muy interesante para quienes disfrutan de la naturaleza y de la gastronomía. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el consumo de setas debe ser responsable y seguro. Es necesario asegurarse de que las setas que se consumen son comestibles y de que se han recolectado en zonas limpias y libres de pesticidas. Además, es importante seguir las recomendaciones de los expertos en micología para evitar cualquier riesgo de intoxicación.



RUTA MICOLOGICA 1: PINO GORDO DEL TORIL
Setas comestibles

HSC: importancia socioeconómica en el mundo



Algunos datos de interés

MACROMICETOS: 2.500 especies de HSC



Stropharia crispa



Sarcosphaera eximia

Morchella spp.

Ascomicetos



- Volvularia speciosa*
- Macrolepiota procera*
- Coprinus comatus*
- Agrocybe segetis*
- Armillaria mellea*
- Ustilago maydis*

Basidiomicetos



Huitlacoche

HSC: importancia socioeconómica en el mundo



Algunos datos de interés

MACROMICETOS: 2.500 especies de HSC

MICORRÍZICOS: 300 especies

Ectomicorrízicos los más valorados comercialmente
Muy pocas especies con mercado global estable: (precio/kg último año, Spain)

<i>Tuber magnatum</i>	3.000 €
<i>Tuber melanosporum</i>	500 €
<i>Tuber aestivum</i>	100 €
<i>Boletus gr. edulis</i>	50 €
<i>Lactarius gr. deliciosus</i>	20 €
<i>Tuber indicum*</i>	100
<i>Tricholoma matsutake*</i>	375 - 1,250
<i>Cantharellus cibarius*</i>	10 - 70

*US\$, according to Wang 2005





HSC: importancia socioeconómica en el mundo

Global Harvest and Trade: several billion € (2.5 - 3 billones €/año)

Puramente Especulativo; Sin Datos Reales Oficiales



Chanterellus + Craterellus
European and American North Countries
US\$ 1.25-1.62 billion



Black & white truffles
Mediterranean countries
US\$ 300 million



Porcini (bolets) & lactarius (Sec. Dapetes)
wide world
US\$ 250 million



Matsutake
Asia and North American countries
US\$ 200 million



trufas

Ascomicetos hipogeos
Simbiontes micorrizicos



Tuber melanospermum
= trufa negra



Terfezia claveryi
= trufa de desierto
= turma



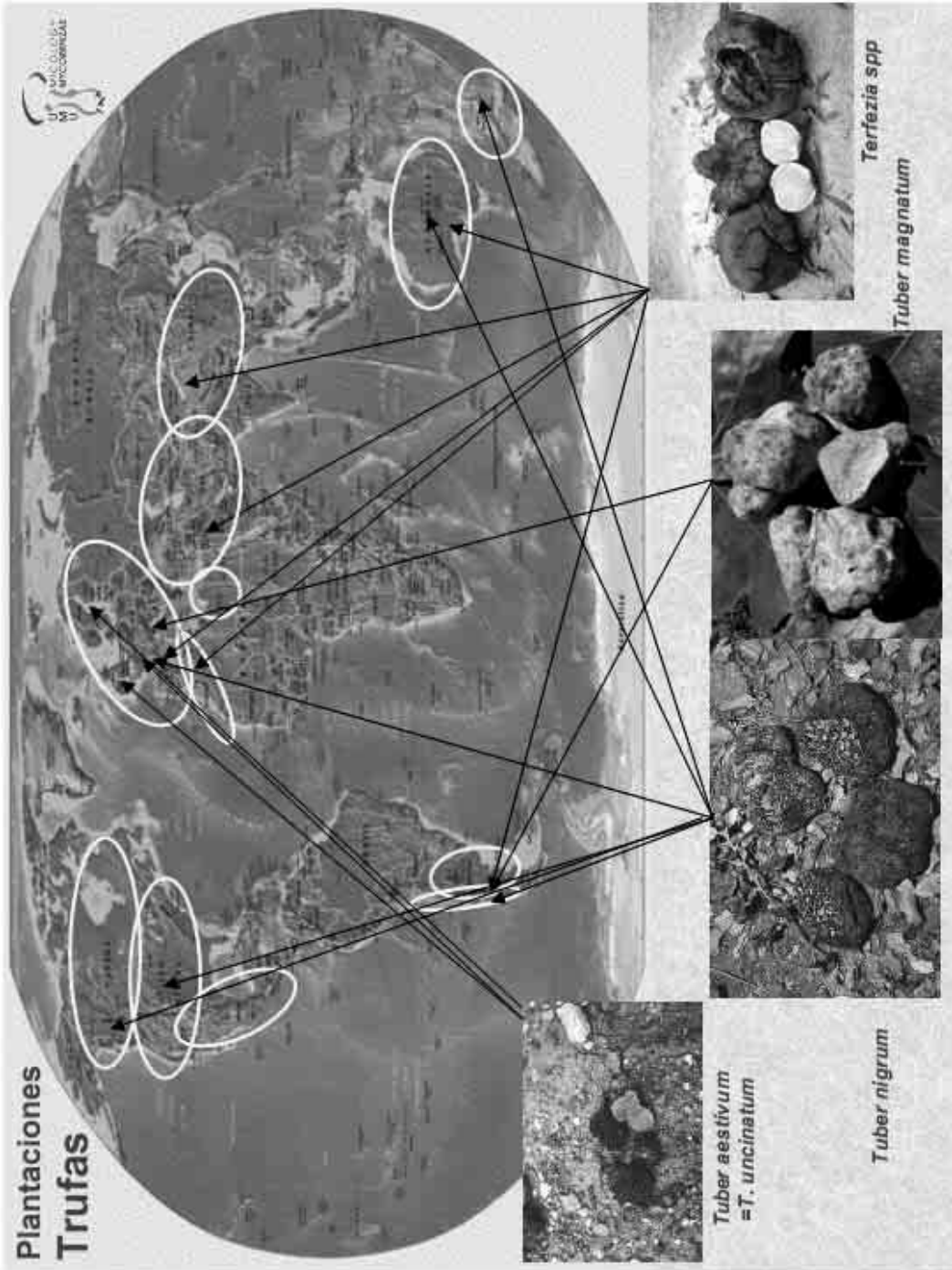
Tuber brumale



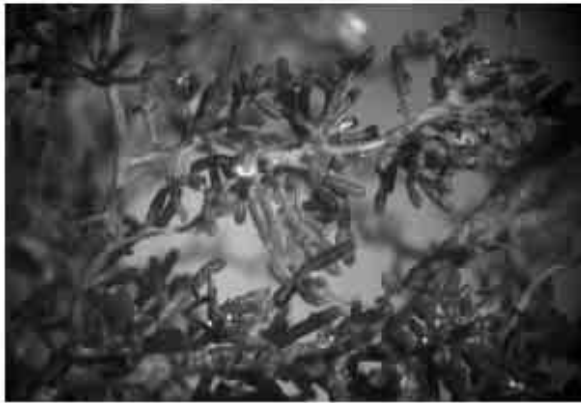
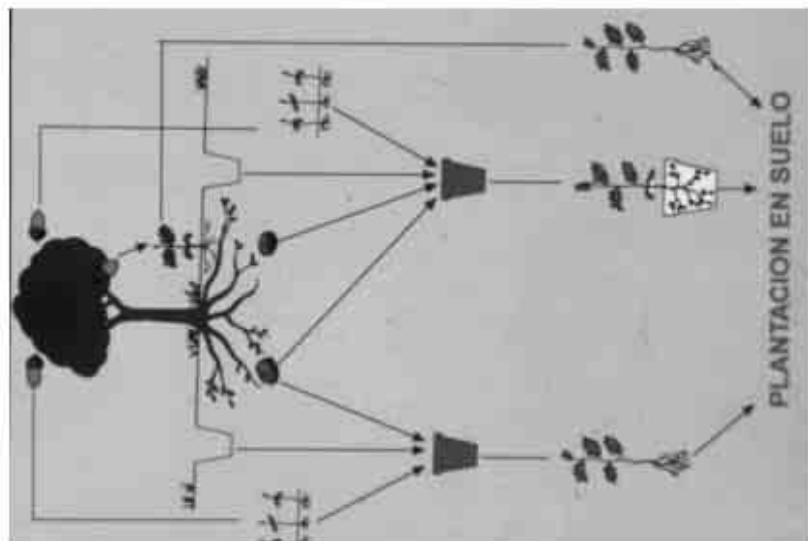
Tuber aestivum
= trufa de verano

T. magnatum





El cultivo de la trufa: hongo simbiote



Planta micorrizada

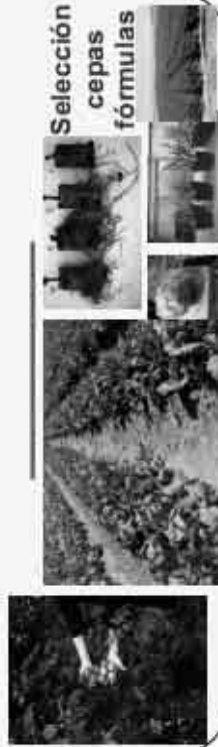




empresa spin-off de la Universidad de Murcia, EBT,
dedicada a la biotecnología de hongos

3 EJES I+D+i

Biofertilizantes microbianos y hongos de Biocontrol



EMC

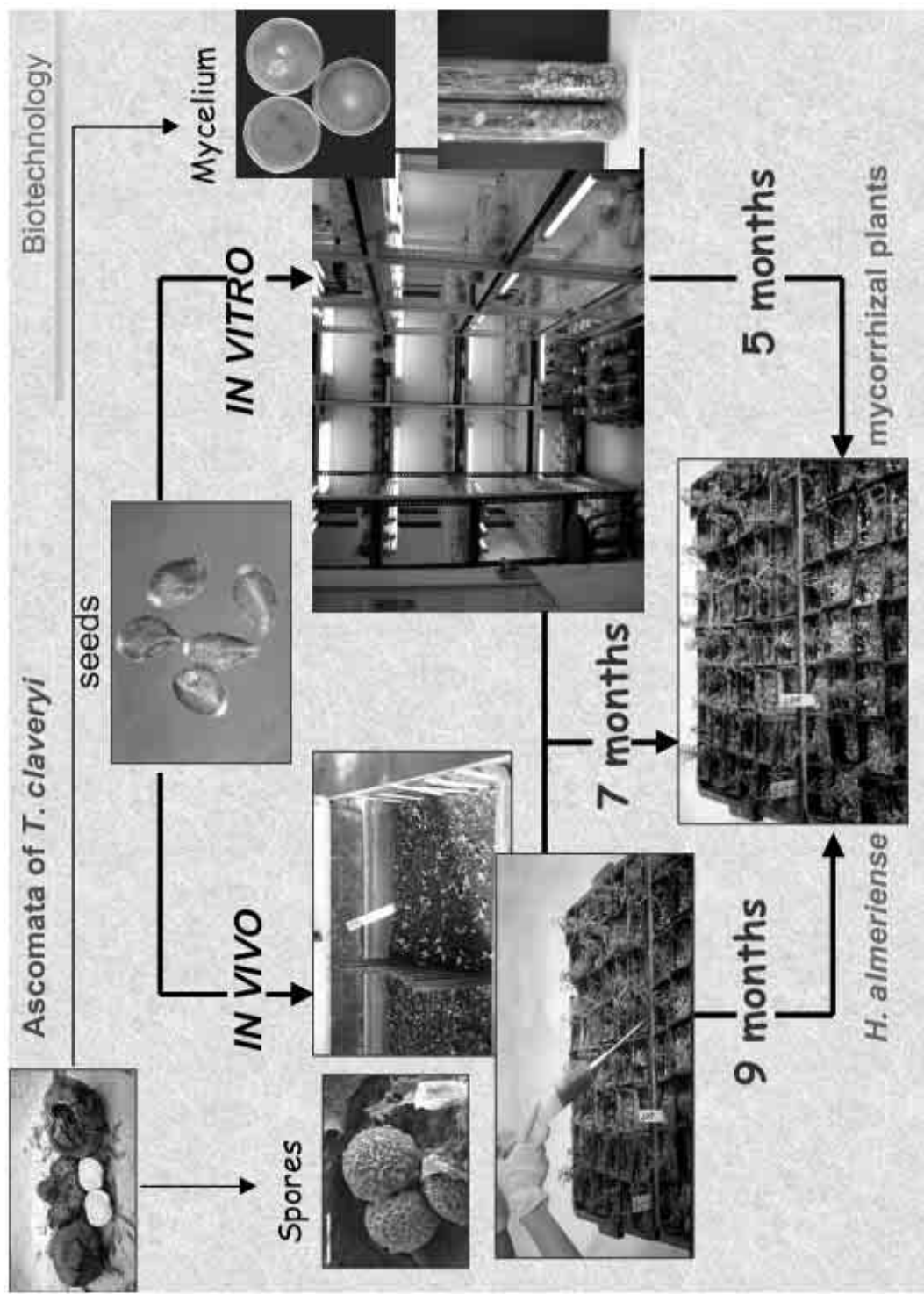


Cultivo

Saprófitos

Sustratos
Residuos
agroalimentarios

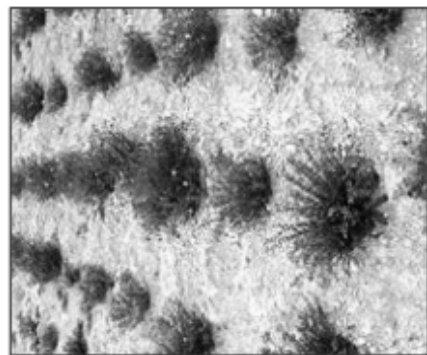






Trufa de Desierto: *Terfezia* spp

Plantaciones y Fructificaciones

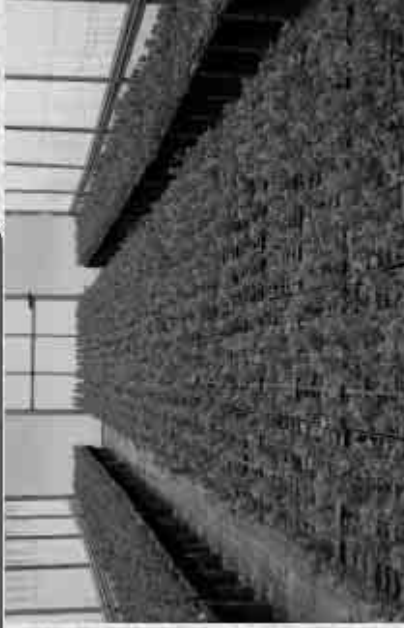


Todas las plantaciones de *Helianthemum almeriense* micorrizadas avec *Terfezia claveryi* han producido trufas a partir de un año de plantacion. A partir del tercer año llegan a producir más de 600 kg/ha/año
Terfezia: 50€/kg

3. Plantas micorrizadas con hongos comestibles Trufas



Jaras
y
encinas



Tuber aestivum
Green oaks



Tuber nigrum
Green oaks



Tuber magnatum





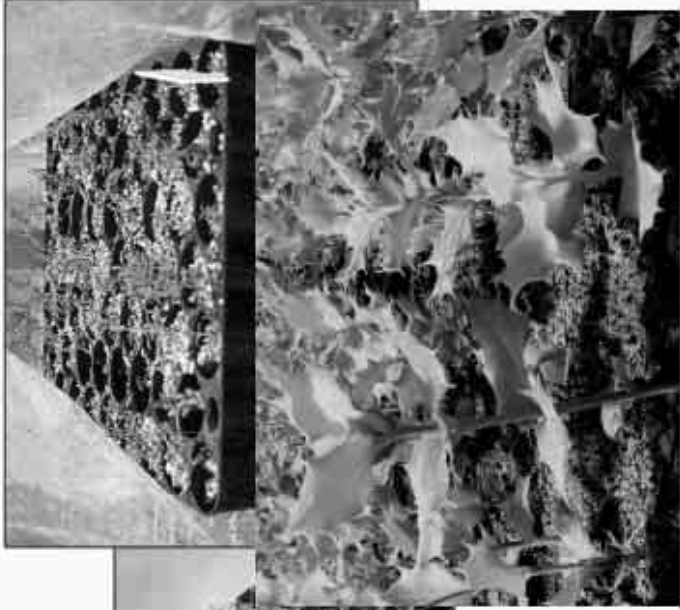
Biotechnologie

Mycorrhization contrôlée

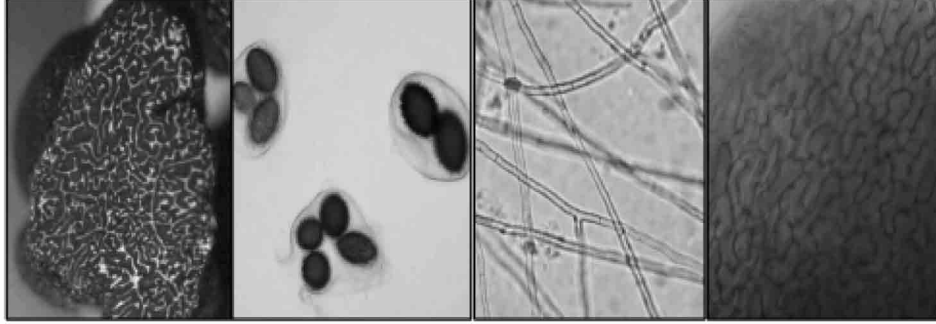
Aclimatation



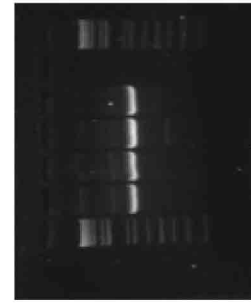
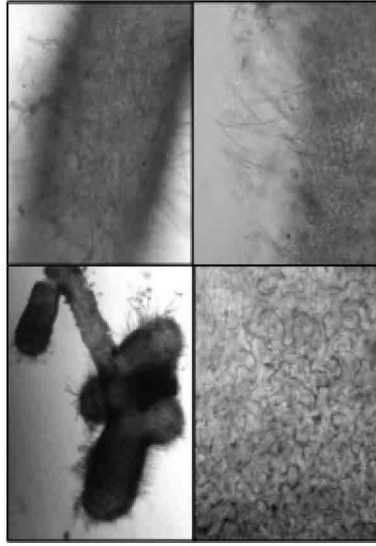
Synthèse
in
vivo



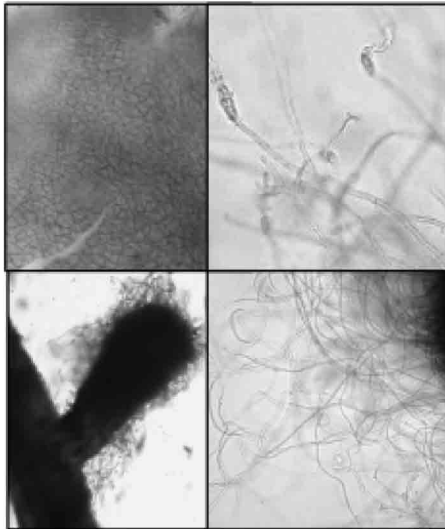
Tuber melanosporum Vitt.



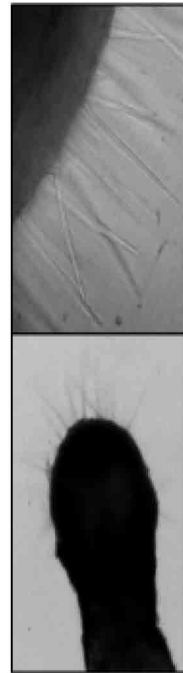
Tuber brumale



Tuber aestivum



Tuber borchii





Helianthemum spp

Quercus ilex L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.



Quercus spp.

Quercus faginea Lam.



Populus spp. *Tilia* spp.

Corylus avellana L.

El cultivo de la trufa negra

Elección del terreno de plantación



Suelos calizos y buen drenaje:

periodos Primario, Secundario-Mesozoico (Triásico, Jurásico, Cretácico), Terciario y aluviales del Cuaternario o recientes, con un predominio de calizas duras del Jurásico Superior.

Suelos características: Suelto, textura equilibrada, calcáreo, poco profundo y bien drenado.

pH próximo a 8.

Relación C/N = 10.

Rico en ácidos húmicos estables.

CaO intercambiable : 4-16 0/00. (Ca ++ importante para mantenimiento y fructificación del hongo).

Pendiente ligera.

No precisa ser rico en elementos asimilables.

Altitud: 400-1500 msnm, exposiciones variables en función de altitud y latitud

El cultivo de la trufa negra

Elección del terreno de plantación



Clima

La trufa negra y la trufa de verano son hongos adaptados a condiciones secas y calurosas, con alternancia de estaciones marcadas, de clima mediterráneo templado húmedo o frío subhúmedo.

Primaveras cálidas y húmedas; Veranos secos con tormentas; Otoños lluviosos sin heladas tempranas e Inviernos fríos, con heladas por debajo de -10°C

Pluviometría entre 400-1300 mm/año

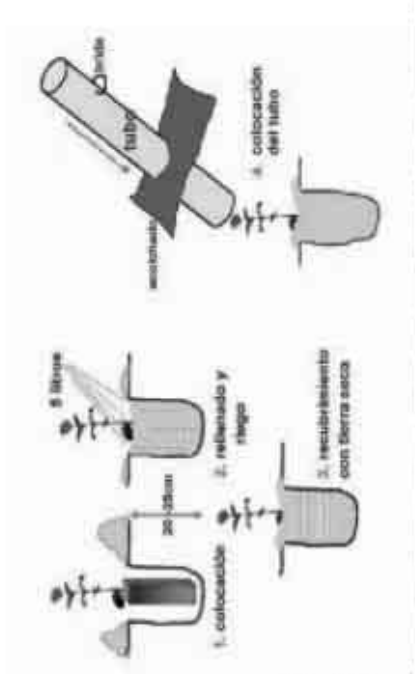


Distribución natural de trufa negra

Preparación del terreno plantación



Dos teorías:
Subsolado
u
Hoyo manual



Preparación del terreno plantación



Enmiendas
Calizas
corrección
de pH



El cultivo de la trufa negra

Laboreo previo y posterior a entrada en producción



Binados y Podas

El cultivo de la trufa negra

Costes de implantación
1 ha



Operación	Horas/ha	Unidades/jornales	Coste/hora	Coste/planta	Coste/jornal	Subtotal (€/ha)
Eliminación del cultivo anterior	6		24			144
Mano obra marcación		2			78	156
Pequeño material						90
Subsolado	2,5		60			150
Mano obra plantación		2			78	156
Coste planta		280		6		1.680
Riego	6		24			144
Vallado						2.100
					TOTAL:	4.620

El cultivo de la trufa negra

Costes de mantenimiento
1 ha

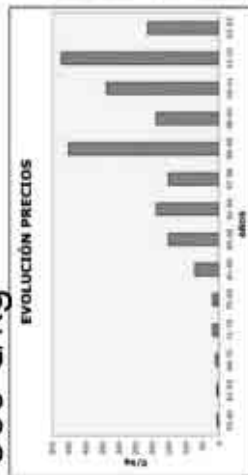


Operación	Horas/ ha	Unidades/ jornales	Coste/ jornal	Coste/ jornal	Subtotal (€/ha)
Riegos manuales	12		24		288
Instalación material riego					3.600
Grados anuales y binas	6		24		144
Reposición material de riego					1.800
Podas fuertes		4,5		128	576
Adquisición y mantenim. del perro					3.000

El cultivo de la trufa negra

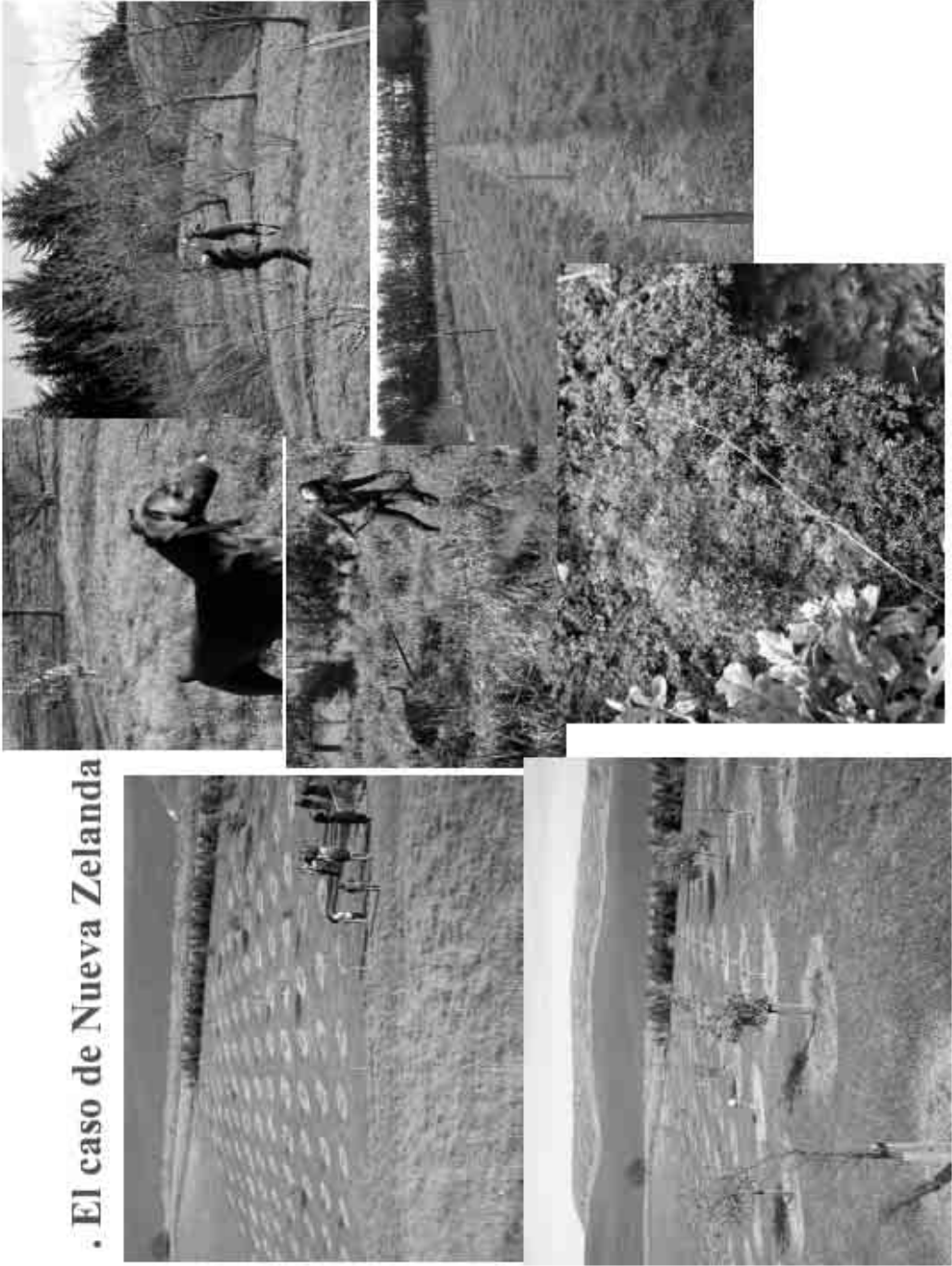
Rendimientos finales
50.500 €/ha

Precios medios:
300 €/kg



TIPO DE PLANTACION	10-20 años	20-30 años	Hasta 50 años
Alta productividad (kg/Ha/año)	30	60	90
Productividad media (kg/Ha/año)	15	30	45
Productividad baja (kg/Ha/año)	3	6	9

. El caso de Nueva Zelanda





cosecha

Conclusiones

Las trufas son una buena alternativa de diversificación agraria
Hay amplitud de cultivos: diferentes especies de trufas

- trufa negra

- trufa de verano

- trufa de desierto

Son un complemento de rentas en áreas deprimidas
Las condiciones de mercado hacen que sus cultivos tengan
alta rentabilidad

Son cultivos con ayudas para forestación
Cultivos con ayudas para diversificación agraria

